

Molekulare Bildgebung mittels [^{18}F]-ML10 zur
Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der kardialen
Apoptose im Ischämie-Modell der Maus

Von

Jessica Olivier

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Molekulare Bildgebung mittels [^{18}F]-ML10 zur
Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der kardialen
Apoptose im Ischämie-Modell der Maus

von

Jessica Olivier

aus Haltern am See

München 2019

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am

Universitäts-Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
Großhadern (Prof. Bartenstein)

Mentor: PD Dr. med. Andrei Todica

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Apoptose.....	2
2.	Myokardinfarkt.....	5
2.1.	Ätiologie und Pathogenese der akuten ischämischen Kardiomyopathie	5
2.2.	Pathophysiologische Veränderung in Folge des Myokardinfarktes.....	6
2.3.	Therapieoptionen.....	8
3.	Positronen-Emissions-Tomographie und Radionuklide.....	10
3.1.	Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie	10
3.2.	Herzbildgebung mit PET unter Verwendung von [¹⁸ F]-FDG	11
3.3.	Apoptose Tracer	14
3.4.	Entwicklung und Eigenschaften von [¹⁸ F]-ML10	15
3.4.1.	Bisherige Anwendung von [¹⁸ F]-ML10	16
4.	Autoradiographie	19
5.	Tiermodell	20
5.1.	In vivo Apoptosedetektion nach Myokardinfarkt im Mausmodell	20
6.	Tiermedizinische Relevanz	21
III.	ZIELSETZUNG	22
IV.	MATERIAL UND METHODEN	23
1.	Material	23
1.1.	Verwendete Medikamente und Tracer in alphabetischer Reihenfolge	23
1.2.	Verwendetes Operationszubehör in alphabetischer Reihenfolge.....	23
1.3.	Verwendete Chemikalien und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge...	24
1.4.	Verwendetes Zubehör der µPET-Messung und Autoradiographie in alphabetischer Reihenfolge	25
1.5.	Verwendete Software in alphabetischer Reihenfolge	26
1.6.	Verwendetes Zubehör Histologie und Immunhistochemie in alphabetischer Reihenfolge	27
1.7.	Verwendete sonstige Geräte und Materialien in alphabetischer	

	Reihenfolge	28
2.	Methoden.....	29
2.1.	Tiermodell	29
2.1.1.	Versuchstiere und Haltung	29
2.2.	Infarktmodell	31
2.2.1.	Modell der permanenten Ischämie	31
2.2.2.	Modell der transienten Ischämie	36
2.2.3.	Schmerztherapie	37
2.3.	Allgemeiner Versuchsaufbau	38
2.3.1.	Versuchsaufbau der μ PET-Messung	40
2.3.2.	Versuchsaufbau der Autoradiographie.....	41
2.4.	Bildgebung	42
2.4.1.	Radiopharmaka.....	42
2.4.2.	Herstellung [^{18}F]-ML10	42
2.5.	Positronen-Emissions-Tomographie	44
2.5.1.	Durchführung	44
2.5.2.	Bildrekonstruktion und Auswertung	46
2.6.	Autoradiographie.....	52
2.6.1.	Durchführung	52
2.6.2.	Organentnahme	52
2.6.3.	Gefrierschnitte der Autoradiographie.....	53
2.6.4.	Auswertung	56
2.7.	Histologische und immunhistochemische Aufarbeitung.....	58
2.7.1.	Prozessierung der Herzen nach der μ PET Messung	58
2.7.1.1.	Färbung nach Giemsa.....	59
2.7.1.2.	TUNEL-Methode	59
2.7.2.	Prozessierung der Herzen nach der Autoradiographie Messung	61
2.8.	Statistische Auswertung	62
V.	ERGEBNISSE	63
1.	Ergebnisse der Autoradiographie.....	63
1.1.	Modell der permanenten Ischämie im zeitlichen Verlauf	63
1.2.	Modell der transienten Ischämie im zeitlichen Verlauf	66
1.3.	Vergleich der Modelle in der Autoradiographie	69

2.	Ergebnisse der μPET-Messung.....	70
2.1.	Modell der permanenten Ischämie im zeitlichen Verlauf	71
2.2.	Modell der transienten Ischämie im zeitlichen Verlauf	73
2.3.	Vergleich der Modelle in der μ PET Messung.....	75
3.	Ergebnisse der Histologie	76
3.1.	TUNEL-positive Zellen in der Gesichtsfeldauswertung	76
3.1.1.	Modell der permanenten Ischämie im zeitlichen Verlauf	77
3.1.2.	Modell der transienten Ischämie im zeitlichen Verlauf	78
3.1.3.	Vergleich der Modelle.....	79
VI.	DISKUSSION	80
1.	Darstellung der kardialen Apoptose im Ischämie-Modell.....	80
2.	Zeitlicher Verlauf der [18F]-ML10 Anreicherung	81
2.1.	Modell der permanenten Ischämie	81
2.2.	Modell der transienten Ischämie	82
2.3.	Vergleich beider Ischämie-Modelle	84
3.	Limitationen.....	87
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	89
VIII.	SUMMARY	91
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	93
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
	DANKSAGUNG.....	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[¹⁸ F]-FDG	2-Deoxy-2[¹⁸ F]-Fluor-D-Glucose, Radiopharmakon
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Bpm	beats per minute, Schläge in der Minute
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
d	day, Tag
Da	Dalton
d.h.	das heißt
EX	Emissionsmessung
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association, Vereinigung europäischer versuchstierkundlicher Gesellschaften
g	Gramm
h	hour, Stunde
H+	Wasserstoff
HWZ	physikalische Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
LAD	Left Anterior Descending Artery
M	Molar
MBq	Megabecquerel
Mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl der Tiere

Na ²⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OP	Operation
p	p-Wert, statistisches Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
rH	relative Humidity, relative Luftfeuchtigkeit
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
s.o.	siehe oben
T	Threshold, Schwellenwert
Tab.	Tabelle
TX	Transmissionsmessung
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZP	Zeitpunkt

I. EINLEITUNG

Ein Drittel aller Todesfälle in der EU sind auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen (1), in Deutschland stellen diese die häufigste Todesursache dar. Zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen unter anderem die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz und die hypertensive Herzkrankheit (2).

Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es zum Untergang von Myokardzellen. Dies passiert unter anderem auf dem Weg der Apoptose (3). Apoptose ist bis zu einem gewissen Punkt regulierbar. Die Beeinflussung bietet somit einen interessanten Ansatz für die Minderung der Auswirkungen von kardiovaskulären Erkrankungen (4), (5). Der Anteil der apoptotischen Zellen ist im Zuge einer kardiovaskulären Erkrankung im Verhältnis zum gesunden Herzen erhöht und trägt zu einem massiven Verlust von Herzgewebe bei (6). Das umfassende Verständnis pathophysiologischer Mechanismen dieser Erkrankungen rückt zunehmend in den Fokus aktueller Forschung. In der Prävalenz vermutlich stark unterschätzt, stellt der akute Myokardinfarkt ebenfalls beim Tier eine ernstzunehmende Erkrankung dar (7), (8). Nicht nur dem Menschen, sondern auch den Tieren kommt eine Bestimmung der Apoptose und möglicher Therapien im Zuge eines Myokardinfarktes zu Gute.

Die in vivo Darstellung von Apoptose mit bildgebenden Verfahren könnte wichtige Informationen für die Detektion und Therapie von Apoptose liefern (9). Deshalb stellt die Etablierung eines radioaktiv markierten Tracers zur Detektion apoptotischer Zellen in der nicht-invasiven Methode der PET-Bildgebung neue Möglichkeiten in der Risikostratifizierung von Erkrankungen, sowie für das Monitoring neuer Therapieansätze dar (10), (11). Mit dieser Thematik befasst sich diese Arbeit.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Apoptose

Apoptose ist ein programmierter Zelltod mit bestimmtem Ablauf und morphologischen Charakteristika (12). Prinzipiell kann die Apoptose über zwei Wege eingeleitet werden, zum einen über den extrinsischen und zum anderen über den intrinsischen Weg (3). Der Ablauf stellt sich als sequentieller, mehrstufiger Prozess dar mit verschiedenen Regulationspunkten, welcher von 20 Minuten bis hin zu 24 Stunden dauern kann (13).

Aktiviert über einen der zwei Wege besitzt die Apoptose drei Startpunkte in der Zelle (14):

1. Eine extrinsische Aktivierung durch Bindung von Liganden an Rezeptoren findet auf der Zellmembran statt. Mögliche Liganden sind FAS, TNF α oder TRAIL (4). In Kardiomyozyten konnte bisher die Expression von FAS- und TNF α -Rezeptoren nachgewiesen werden (3). Die jeweiligen Rezeptor Liganden haben eine Cytoplasma Domäne zur Signaltransduktion, die sogenannte DD (death domain), welche Procaspase 8 bindet und aktiviert (12). Caspase 8 wiederum aktiviert Caspase 3, welche die kennzeichnenden Vorgänge der Apoptose aktiviert (3).
2. Die intrinsische Aktivierung per Mitochondrium führt durch Cytochrom C zur Aktivierung der Caspase 9, welche die Caspase 3 aktiviert. Dieser Weg wird zum Beispiel bei DNA-Schädigung aktiviert. Durch vermehrte Freisetzung von p53 wird die Transkription von proapoptotischen Faktoren erhöht, welche wiederum die Apoptose aktivieren (12). Ebenfalls möglich ist die Aktivierung des intrinsischen Weges durch Agentien, welche zuvor durch Reactive Oxygen Species (ROS) gebildet werden. Diese aktivieren Cytochrom C, welches auf der Außenseite der inneren Membran sowie im Intermembranspalt der Mitochondrienmembran liegt (15). Insgesamt führen auch diese Prozesse zur Aktivierung der Apoptose.
3. Endoplasmatischer Retikulum Stress ist unabhängig vom extrinsischen und intrinsischen Weg und verursacht die Aktivierung von Caspase 12. Damit wird die Apoptose eingeleitet. Dieser mögliche Weg für den apoptotischen Zelltod ist jedoch nicht wesentlich (12).

Es wurde ebenfalls festgestellt, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem extrinsischen Weg mittels Ligandenaktivierung und dem mitochondrialen Weg besteht (15). Die Aktivierung von Caspase 8 per Ligand führt zur erhöhten Bildung von BID, einem proapoptotischen Stoff, welcher wiederum Cytochrom c freilässt (12).

Wie erkennbar führen der extrinsische und intrinsische Weg letztlich zur aktivierten Caspase 3, diese ist in ihrer Wirkung essentiell für die Charakteristika der Apoptose (16). Eine Besonderheit des Herzens stellt hier die Möglichkeit der Caspasen-unabhängigen Aktivierung der Apoptose dar. Vermutlich geschieht dies durch Apoptose induzierende Faktoren (AIF). AIF befinden sich in der Mitochondrienmembran und beim Vorgang der Apoptose durch oxidativen Stress veranlassen diese Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Ebenso gibt es in Kardiomyozyten die Möglichkeit der DNA-Spaltung per Endonuklease G. In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass die Endonuklease G eine Rolle im Reperfusion mediierten Zelltod spielt (3). Große Bedeutung ist hier dem Punkt beizumessen, dass Apoptose als Zelltod bis zur Aktivierung bestimmter Prozesse reversibel ist und mögliche beeinflussende Faktoren bereits erforscht werden (4), (5). Wichtig ist, dass sich mögliche Schäden und Veränderungen nur im Zytosol abgespielt haben, jedoch der Zellkern weiterhin intakt und funktional ist (17).

Zunächst findet eine Zellschrumpfung sowie eine Kondensation (Pyknosis) und Margination des Chromatins statt. Durch die Aktivierung von Ca^{2+} abhängigen Endonukleasen kommt es zur Chromatinfragmentierung und somit zur Fragmentierung des Zellkerns (Karyorhexis) (18). Die DNA wird durch diese in Doppelstrang-Fragmente von 180 - 200 Basenpaaren gespalten, welche das charakteristische DNA ladder pattern darstellen (19). Ebenfalls findet ein Kräuseln der Zellmembran (Ruffling) bis hin zur zellulären Fragmentierung statt. Bei dem Vorgang des so genannten Buddings kommt es unter Erhalt der Zellmembranintegrität zum Abschluss der Apoptose. Entstandene apoptotische Körperchen sind Beispielsweise beim Myokardinfarkt frühestens 12 Stunden nach Reperfusion auffindbar (20). Letztlich werden die apoptotischen Körperchen per Phagozytose durch Phagozyten und benachbarte Zellen unter Vermeidung einer exsudativen Inflammation aufgenommen und abgebaut (3), (19).

Morphologisch und biochemisch gilt es die Apoptose von anderen Zelltodformen, wie der Onkose und Nekrose abzugrenzen (21). Bei einer Schädigung des Sarkolemm sowie einer veränderten Membranpermeabilität kommt es zur Onkose. Durch einen unregulierten Einstrom von di- und trivalenten Kationen findet eine Zell- und Organellenschwellung bei gleichzeitiger Chromatinkondensation (Pyknosis) statt (19). Es entstehen zunächst Löcher, dadurch kommt es zu einer zellulären und nukleären Auflösung (Karyolysis). Schließlich findet eine Ruptur der Membran (Blebbing) unter Freisetzung des Zellinhaltes und folgender sekundärer Inflammation statt. Dieser passive, unregulierte Vorgang steht im Gegensatz zum organisierten Ablauf der Apoptose (22). Im Zuge eines Myokardinfarktes kommt es vor allem in Bereichen mit vollständiger Hypoxie zu Nekrosen. Das Freiwerden von Zellinhalt durch den Integritätsverlust der Zellmembran löst eine Inflammation mit einem initialen Einstrom von Neutrophilen aus (19). Zu betonen ist hier noch einmal, dass es sich bei der Onkose und Apoptose um Prozesse vor dem definitiven Zelltod handelt und die Nekrose den postmortalen Ablauf der Zellen darstellt (12)).

2. Myokardinfarkt

2.1. Ätiologie und Pathogenese der akuten ischämischen Kardiomyopathie

Zu den wichtigsten Risikofaktoren des Menschen für die Entstehung einer akuten ischämischen Kardiomyopathie gehören Adipositas, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Nikotinabusus, familiäre Disposition sowie psychosoziale Faktoren (23), (24).

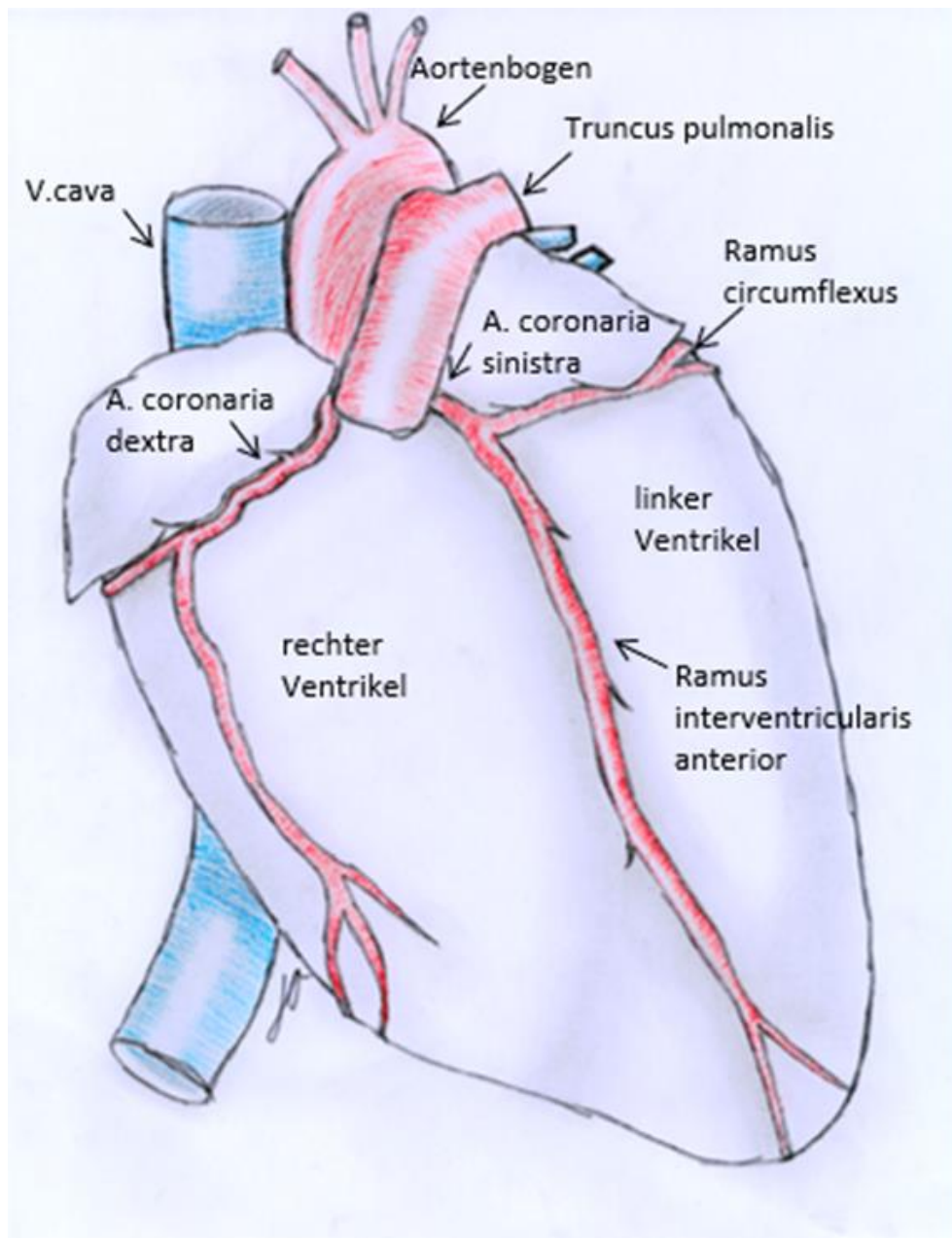


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Herzens (Skizze Jessica Olivier).

Zunächst kann es zur Atherosklerose der Herzkranzgefäße (*Arteriae coronariae*) kommen, welche das Gefäßlumen einengt und die Blutversorgung des Herzmuskels zunehmend einschränkt (10). Abbildung 1 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt der Lage der Herzkranzgefäße. „Krisenhafte akute Myokardischämien in Ruhe sind in der Regel Folge einer Plaqueruptur bzw. Plaqueerosion mit nachfolgender Bildung eines Thrombus, der das betroffene Gefäß ganz verschließen (akuter Myokardinfarkt) oder zu einer hochgradigen Reduktion des Blutflusses führen kann (instabile Angina pectoris). Neben der Plaqueruptur können Vasospasmen und koronare Entzündungsvorgänge eine myokardiale Ischämie triggern.“ (23). Während der ischämischen Kardiomyopathie kommt es zur Minderversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff, Glukose und Fettsäuren sowie zu fehlendem Abtransport entstehender Stoffwechselprodukte und freier Radikale (25).

2.2. Pathophysiologische Veränderung in Folge des Myokardinfarktes

Dem Verschluss eines versorgenden Gefäßes im Herzen, dementsprechend einem Myokardinfarkt, folgt ohne zügige Reperfusion des betroffenen Gebietes ein Absterben der Myozyten. Entscheidend für den Erhalt von Myozyten sind besonders die ersten 24 Stunden nach erfolgtem Myokardinfarkt (26). Das Absterben der Kardiomyozyten geschieht auf verschiedenen Wegen, welche als Apoptose, Nekrose oder Autophagie sowie Mischformen ablaufen (3). Nach der vom Myokardinfarkt verursachten Nekrose, Apoptose und Autophagie werden Zellen, welche nicht erneuert werden können, durch sekundäre Fibrose ersetzt (13). Autophagie sowie Apoptose finden sich in diesem Stadium nach Infarkt vornehmlich in subletal geschädigtem Gewebe und im Periinfarktgebiet, Penumbra genannt. Nekrose läuft während und nach einem Myokardinfarkt dort ab, wo keine vaskuläre Versorgung mehr vorzufinden ist. Diese Abläufe und die verschiedenen darauffolgenden Vorgänge werden als kardiales Remodeling bezeichnet (27). Kardiales Remodeling stellt einen progredienten, multifaktoriellen Umbauprozess dar, welcher durch eine Schädigung des Herzens angeregt und durch sich selbst katalysiert wird (10), (11). Zunächst ist dieser Prozess adaptiv und sichert den Erhalt der Funktionsfähigkeit des Herzens. Über die Aktivierung der anaeroben Glykolyse kommt es zur Akkumulation von

Protonen (H^+) und folglich zur Azidose in den betroffenen Zellen. Um der Azidose entgegenzuwirken wird ein Austausch von H^+ gegen Natriumionen (Na^+) forciert. Weiter kommt es zu einem Austausch von Na^+ gegen Kalziumionen (Ca^{2+}). Ca^{2+} akkumuliert und die Ca^{2+} -abhängige Dehydrogenase verbraucht vermehrt Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und Elektronen. Vorhandene Energieträger werden verbraucht bis das Ca^{2+} Level durch den Protonengradienten limitiert wird (3). Es kommt durch den Zusammenbruch der Homöostase zum Anschwellen der Zelle und letztlich zum Integritätsverlust der Zellmembran. Die folglich austretenden Zellbestandteile verursachen Inflammation, die einwandernden Zellen und der Abbau dieser verursacht ebenfalls weiteren Schaden (18), (28).

Gesteuert durch Hormone, Zytokine und biomechanische Faktoren, übernehmen verbleibende Herzzellen die Leistung des fehlenden Myokards. Dies führt zu einer Muskelmassenzunahme (Hypertrophie), welche zunächst funktionell ist (15). Integrine übersetzen hier den mechanischen Stress der hämodynamischen Überlastung über die Bindung von spezifischen Proteinen in ein biomechanisches Signal. Im zeitlichen Verlauf wird unter den herrschenden Druck- und Zugverhältnissen das entstandene Narbengewebe gedehnt, da es ihm an elastischen und kontraktilen Fasern mangelt. Die fortschreitende Dehnung des Narbengewebes vergrößert die Fläche des nicht kontrahierenden Myokards, es kommt zu einer Herzerweiterung (Dilatation) (9). Die Arbeitslast der übrigen Zellen steigt (29). Es kommt erneut zu Hypertrophie, um weiterhin das benötigte Herzzeitvolumen bereitstellen und der Druckbelastung standhalten zu können (30). Zumeist findet keine ausreichende Neovaskularisation im Verhältnis zur geschaffenen Muskelmasse im hypertrophierten Gewebe statt. Diese maladaptive Hypertrophie bedingt wiederum vermehrt Zelltod und kann weitere ischämische Myokardschäden begünstigen (3), (31). Beteiligt ist bei diesen Anpassungsreaktionen Angiotensin II mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Aldosteron und Angiotensin II induzieren Endoplasmatischen Retikulum Stress (3) und stimulieren im Myokard durch Oxidasen die Produktion von ROS, zu welchen Superoxide, Hydrogen Peroxide und Hydroxylradikale gehören. Die Auswirkungen durch die ROS werden unter dem Begriff des oxidativen Stresses zusammengefasst, welche zu einer endothelialen Dysfunktion und somit schlechteren Durchblutung führt. Weiterhin spielen erhöhte Zytokinlevel eine

Rolle. Beispielsweise kann der Tumor Nekrose Faktor- α unmittelbar Apoptose induzieren und ist im Stadium der Herzinsuffizienz in erhöhtem Maße im Herzmuskel nachzuweisen. Verschiedene Katecholamine lösen z.B. über dauerhafte Aktivierung von adrenergen Rezeptoren und der daraus folgenden positiven inotropen und chronotropen Wirkung durch Kalziumüberladung Nekrose aus. Bei der pathologischen kardialen Hypertrophie fördern die genannten Faktoren abermals Zelltod und Fibrose. Es besteht ein geringfügiges, jedoch signifikant erhöhtes, stetiges Level an apoptotischen Zellen. In einem gesunden Herzen findet sich dauerhaft ein Anteil von 0,001 - 0,002 % apoptotischer Zellen, bei einem Herzen mit Herzinsuffizienz steigt dieser auf bis zu 0,25 % an (3).

Einhergehend mit dem geringen, jedoch kontinuierlichen apoptotischen Zellverlust nach Myokardinfarkt führt das Remodeling letztlich zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion (3). Diese mündet schlussendlich in der Dekompensation der Herzfunktion und folgendem Herzversagen (15). Ein Eingriff in den Ablauf der Apoptose nach Myokardinfarkt bildet daher einen Ansatzpunkt um unnötigen Zelltod von differenzierten, nicht ersetzbaren Kardiomyozyten zu verhindern (17).

2.3. Therapieoptionen

Als Mittel der Wahl zur Therapie eines akuten Myokardinfarktes gilt derzeit eine frühzeitige Reperfusion des ischämischen Herzmuskelgewebes per Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes (11), (32). Besonders entscheidend sind hier die ersten 48 Stunden nach Myokardinfarkt (33). Zentral im Gebiet der Ischämie zeigt sich Onkose mit folgender Nekrose und peripherer Apoptose (34). Die besonders von Apoptose betroffene Randzone wird auch als „Area at Risk“ bezeichnet (13). Schon 1996 stellten Cheng et al. fest, dass das Sterben von Myozyten durch Apoptose einen wichtigen Faktor des ischämischen Myokardschadens darstellt. Bestätigt wurde diese Erkenntnis durch Olivetti et al. (13), (35). Nach erfolgreicher Reperfusion findet auf Grund der wiederhergestellten Energiezufuhr im gesamten Infarktbereich vorwiegend Apoptose statt (36), da durch die Ischämie entstandene, zunächst onkotische Zellen durch diese Therapie in Apoptose übergehen können (19). Auch durch die

Reperfusion selbst kann weiterer Zellschaden entstehen (37), (38), (22). Durch das Freiwerden von angestauten Stoffwechselprodukten der bereits nekrotischen Zellen werden weitere Zellen geschädigt und gehen in die Apoptose über. Dieser weitere Schaden wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (20), (39). Im Einzelnen ist schwer zu differenzieren welcher Zelltod direkte Folge der Ischämie oder der Reperfusion ist (25), (20). Im Gesamtbild zeigt jedoch eine zeitnahe Versorgung des zunächst ischämischen Gebietes eine bessere Bilanz hinsichtlich des Zellschadens als ein weiter bestehendes Infarktgebiet (38), (20), (40). Es konnte festgestellt werden, dass der entstandene Myokardschaden durch die Reperfusion prinzipiell beeinflussbar ist (17).

Langfristige Behandlungen zielen mittels medikamentöser Einstellung unter anderem auf den Blutdruck, den Pumpwiderstand und die Herzfrequenz ab (11), (41). Letztlich wird hierdurch das Voranschreiten des Remodelings hinausgezögert, ersetzt jedoch die verlorenen Zellen nicht (42). In den letzten Jahren wurde als eine neue Möglichkeit der Zugewinn an Herzzellen mittels Stammzelltransplantation erforscht, um durch diese eine Verkleinerung der Infarktgröße sowie eine Verbesserung der Pumpfunktion zu ermöglichen (3). Es konnte bereits bestätigt werden, dass die Differenzierung der Stammzellen in Herzmuskelzellen möglich ist (43). Experimentell wird ebenfalls versucht über die Mobilisierung mittels Parathormon, endogene Knochenmarksstammzellen zu aktivieren. Bisher zeigen sich im Zuge dessen überwiegend parakrine Effekte, ein gewünschtes Stammzellhoming erscheint bisher nur eingeschränkt möglich (44), (45). Jedoch haben diese nachweislich einen positiven Effekt auf die kardiale Pumpfunktion (46), (47), (33).

Ziel aller Therapien ist es Zelltod zu verhindern und Remodeling im Verlauf bis zu einem bestimmten Punkt zu beeinflussen, wobei eine bereits entstandene Vernarbung immer irreversibel ist (48).

3. Positronen-Emissions-Tomographie und Radionuklide

3.1. Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie

Das Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nutzt Moleküle, die mit Positronenstrahlern markiert sind, für die nicht invasive Darstellung metabolischer Vorgänge. Das Messprinzip der PET basiert auf der Detektion von zwei Vernichtungsquanten (511 keV). Bei dem Beta Plus Zerfall erfolgt die Umwandlung eines Protons in ein Neutron bei gleichzeitiger Emission eines Positrons und eines Neutrinos aus dem Kern. Trifft das entstandene Positron auf ein Elektron findet eine Annihilation statt. Es wird ein hochenergetisches Photonenpaar frei, wobei jedes Photon in entgegengesetzter Richtung emittiert wird. Das räumlich entgegengesetzte Auftreffen dieser beiden Photonen auf die ringförmig angeordneten Detektoren des PET-Scanners kann somit als sogenannte Koinzidenz (5 ns) erfasst werden. Aus der Summe der Koinzidenzen entlang sehr vieler Messrichtungen kann die dreidimensionale Verteilung der Positronen-Annihilationen berechnet werden (49). Die räumliche Auflösung beträgt bei klinisch eingesetzten Geräten ca. 4mm und bei speziellen Geräten für kleine Tiere, einem so genannten μ PET ca. 1-1,5 mm (50).

Eine Streuung der Vernichtungsstrahlung auf dem Weg durch den Körper verändert die Flugrichtung des Photons. Wird das gestreute Photon im Detektor nachgewiesen, führt dies zu falschen Koinzidenzlinien und somit zu Fehlortung, also Untergrund, im rekonstruierten Bild. Durch Streuung und Absorption kann ein Photon auch dem Nachweis im PET-Detektor entgehen. Dadurch wird die Zahl der entlang einer Koinzidenzlinie gemessenen Ereignisse reduziert. Dieser Effekt wird Schwächung genannt und führt dazu, dass die rekonstruierte Aktivitätsverteilung nicht realistisch ist (51). Um die Auswirkung der genannten Fehlerquellen zu minimieren, nutzt man die Möglichkeit einer externen, nicht im Tier befindlichen Quelle. Die Quelle kreist um das im PET befindliche Tier, wodurch das Maß der Streuung und der Abschwächung während der Transmissionsmessung erfasst werden kann (52). Die gewonnenen Informationen werden bei der mathematischen Rekonstruktion der Schnittbilder berücksichtigt (53).

3.2. Herzbildgebung mit PET unter Verwendung von [^{18}F]-FDG

Hochrisikopatienten zu identifizieren, die Prognose zu bestimmen und ihr Therapieansprechen zu evaluieren wird mit Hilfe der nicht-invasiven Bildgebung mittels PET durch die Darstellung des Glukosestoffwechsels in vivo, mittels Glukoseanalogon [^{18}F]-FDG, kurz für 2-Deoxy-2 [^{18}F] Fluor-D-Glukose, möglich (11), (54). Prinzipiell werden im vitalen Myokard zur Energiebereitstellung im Ruhezustand Fettsäuren verstoffwechselt und nur 30 % der benötigten Energie wird per Glukose bereitgestellt (55). Unter dem Einfluss verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel körperlicher Belastung, Hypoxie und Insulinausschüttung, kann jedoch auf die Verwendung von Glukose bei entsprechendem Blut-Glukose-Level, zur Energiebereitstellung im Herzen umgestellt werden (56). Somit findet nach akutem Myokardinfarkt ein Substrat-Shift statt. Die Glukoseutilisation wird im nicht betroffenen, weiterhin durchblutetem Myokardbereich hochreguliert und zeigt entsprechend eine höhere Anreicherung von [^{18}F]-FDG im Vergleich zum vollständig gesunden Herzen (57). Als Glukoseanalogon wird [^{18}F]-FDG über Glukosetransporter in Zellen aufgenommen und durch eine Hexokinase phosphoryliert. In dieser Form kann [^{18}F]-FDG nicht weiter metabolisiert werden und akkumuliert in den Zellen (58). Abbildung 2 zeigt eine repräsentative [^{18}F]-FDG Anreicherung in einer gesunden Maus; das Fadenkreuz zeigt die Lage der korrespondierenden Schnittebenen.

[^{18}F]-FDG Bildgebung wird ebenfalls im Tiermodell verwendet. Eine standardisierte Stoffwechselsituation soll für diese Messung gewährleistet sein, weshalb beim Handling der Maus die Diät, Temperatur und Narkose beachtet werden müssen (59). Neben der Analyse der ventrikulären Funktion eignet sich die Methode der [^{18}F]-FDG PET-Bildgebung auch zur myokardialen Vitalitätsdiagnostik im Herzen (41), (60), (61). Außerdem bietet sich hier die Möglichkeit serieller Messungen mit Kontrolle des Verlaufs z.B. der Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (62), (63).

Besonders anspruchsvoll gestaltet sich die Bildgebung durch die geringe Größe und die schnelle Herzfrequenz im Modell der ischämischen Kardiomyopathie der Maus dennoch ist dieses Verfahren bereits etabliert und vielfach eingesetzt (64), (65), (66), (67).

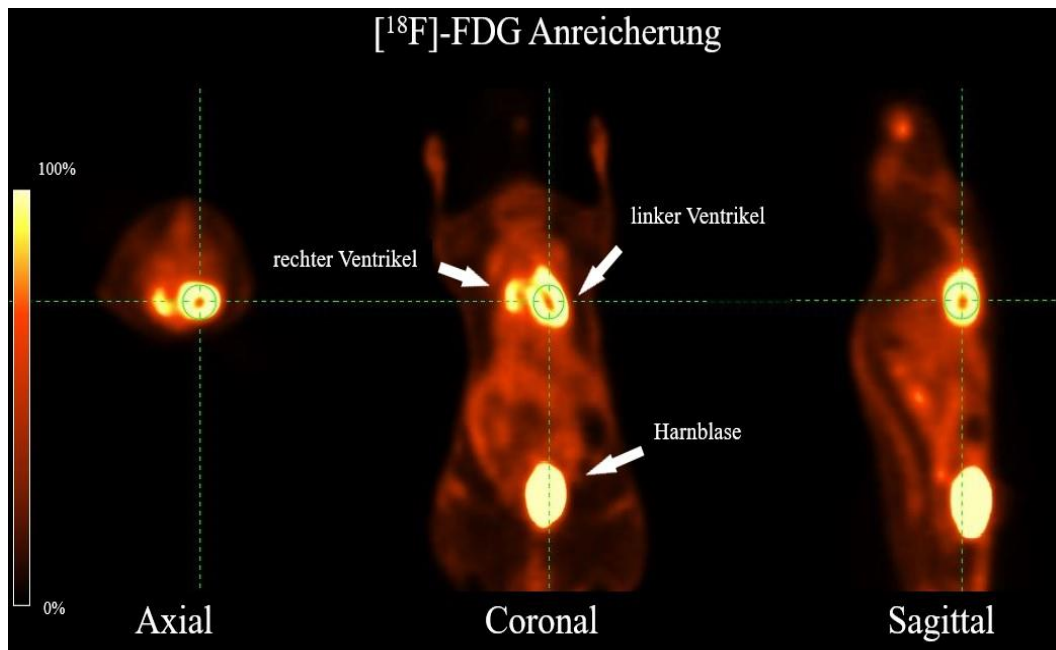


Abbildung 2: Übersicht einer Maus in der μ PET-Bildgebung mittels [¹⁸F]-FDG in verschiedenen Schnittebenen: Darstellung mit Fadenkreuz (Farbskala Volcano; Beispiel aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Großhadern).

Wie bereits beschrieben, kann das Glukose-Analogon [¹⁸F]-Fluordesoxyglukose somit zur Darstellung vitalen Herzgewebes, zur möglichen Therapiebewertung und auch zur Lokalisation und Abgrenzung des Infarktgebietes verwendet werden (siehe Abbildung 3) (41), (69).

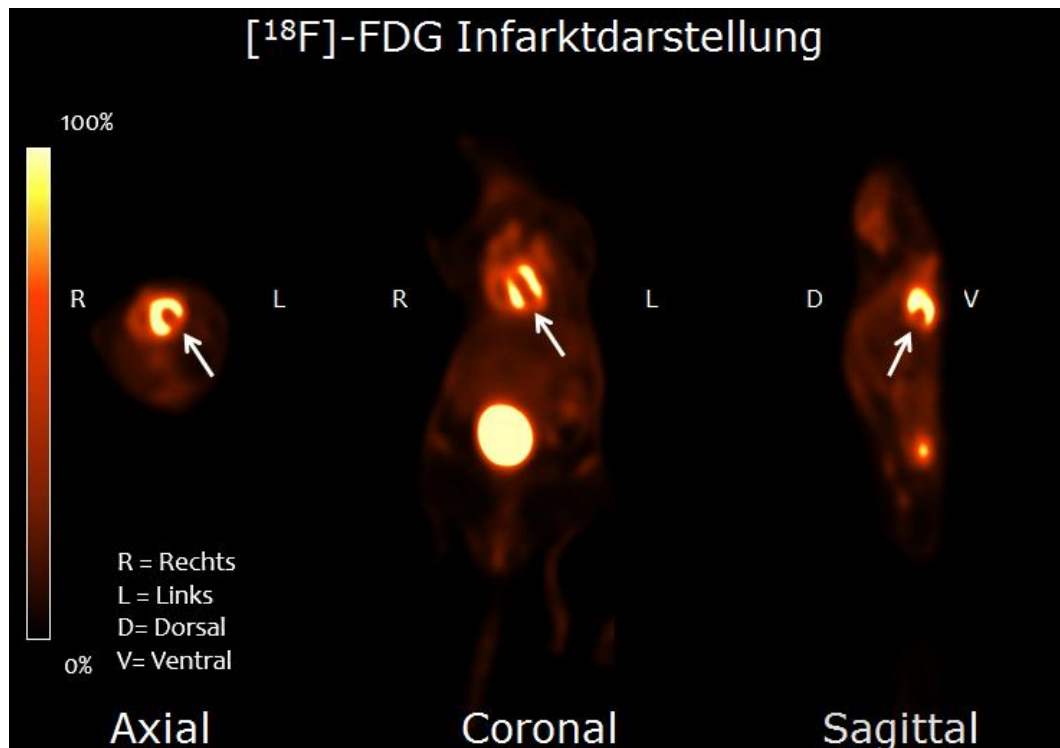


Abbildung 3: Messung eines gesamten Tieres (Maus) in verschiedenen Schnittebenen mittels [¹⁸F]-FDG im Modell der permanenten, ischämischen Kardiomyopathie: Weißer Pfeil deutet auf das Infarktareal hin (Farbskala: Volcano; Beispiel aus dieser Studie).

Weiterhin bietet sich durch eine kombinierte Messung von Tracern, die Möglichkeit der Lagezuordnung der durch andere, spezifische Tracer markierten Bereiche im Vergleich zum dargestellten Infarktbereich in der [¹⁸F]-FDG Messung.

3.3. Apoptose Tracer

Den Zelltod und insbesondere Apoptose in vivo, per molekularem Imaging, darstellen zu können, bildet ein Forschungsfeld mit großem Potential hinsichtlich zukünftiger Krankheits- und Therapieevaluationen (70). Hier gilt es individuell, das Maß der Apoptose im Krankheitsverlauf exemplarisch nach Myokardinfarkt oder im Rahmen einer Tumorbehandlung festzustellen (71). Im Speziellen wird der relative Beitrag der Apoptose an der kardialen Pathophysiologie kontrovers diskutiert, da die Unterscheidung der Zelltodformen und die Quantifizierung in vivo bisher nicht möglich ist (72), (6). Es wurden bereits zahlreiche Versuche mit unterschiedlichen Ansatzpunkten in der Entwicklung möglicher Tracer unternommen (22). Hierunter fallen radioaktiv markierte Tracer wie Annexin-V, C2-Domänen des Synaptogamin I, Caspase Substrate, Fluorobenzyl triphenylphosphonium, welche unterschiedlich an charakteristische Eigenschaften der Apoptose ansetzen (73). Diese Tracer stellen in ihrer Protein- oder Peptidstruktur größere Stoffe dar, welche sie in ihrem Einsatz bezüglich der Biodistribution, der Spezifität und möglicher Immunogenität einschränken (74), (75). Ebenso zeigten sich in bisherigen Versuchen Einschränkungen hinsichtlich einer schlechten Eliminationsrate aus nicht apoptotischen Zellen sowie schlechter Anreicherung in Zielzellen (76), (72). Als Beispiel ist hier der präklinisch eingesetzte Tracer Annexin V zu nennen. Annexin V ist ein Protein, welches an Phospholipide bindet und eine besonders hohe Affinität für Phosphatidylserin besitzt (77). Phosphatidylserin wird von apoptotischen Zellen externalisiert, jedoch findet es sich ebenfalls bei nekrotischen Zellen, was zu einer schlechteren Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose durch Annexin V führen kann (36).

3.4. Entwicklung und Eigenschaften von [^{18}F]-ML10

Mit einer Molekülgröße von 206 Da stellt ML10 (2-(5-Fluoro-pentyl)-2-methyl-malonat) (siehe Abbildung 4) eine small molecule Probe dar. Spezifisch für apoptotische Zellen wurde ML10 aus dem Alkyl-Malonat Motiv des γ -Carboxyglutamat entwickelt. γ -Carboxyglutamat spielt eine entscheidende Rolle in der Bindung von Gerinnungsfaktoren an anionische Phospholipidoberflächen (74). Bereits 2009 konnten Cohen et al. nachweisen, dass Tritium markiertes ML10 in apoptotische Zellen selektiv aufgenommen wird und in diesen akkumuliert, während es in vitale Zellen nicht aufgenommen werden kann und aus nekrotischen Zellen durch den Membranintegritätsverlust austritt (76). Für die nuklearmedizinische Weiterentwicklung hinsichtlich der radioaktiven Markierung für die klinische in vivo PET Bildgebung wurde [^{18}F]-Fluorid gewählt.

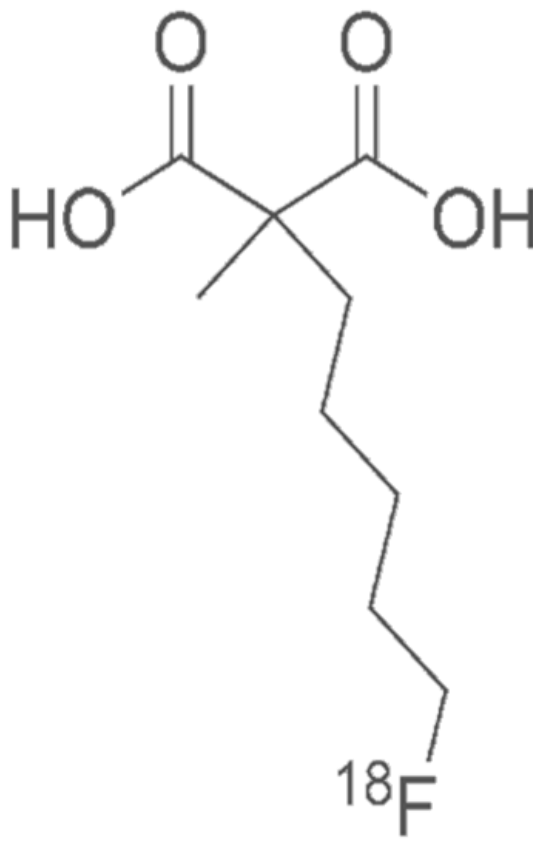


Abbildung 4: Chemische Strukturformel ML10

Bisher konnte erfasst werden, dass ML10 durch die Membranansäuerung und die Membranpotentialänderung im Zuge der Apoptose, eine selektive Membraninteraktion, der Transmembrantransport und letztlich die Akkumulation in der apoptotischen Zelle ermöglicht wird (74). Bekannt ist, dass ML10 nicht über die Zellmembran transportiert wird, sondern diese wahrscheinlich auf Grund von Wechselwirkungen passiert (75). Die Membranansäuerung führt vermutlich zur Veränderung der Protonierung des ML10 und somit zu einer Konformationsänderung, welche die Membraninteraktion ermöglichen könnte. Denkbar ist hier im Anschluss ein „Flip-Flop“ des ML10-Moleküls durch die Membran hin zur inneren Zellmembran und eine Bindung an zytoplasmatische Proteine durch elektrostatische und hydrophobe Interaktionen (78). Die Membranpotentialänderung stellt einen der ersten Schritte im Ablauf des programmierten Zelltodes dar und bleibt bis zur finalen Degradierung der Zelle erhalten (36). Die apoptosetypischen Veränderungen fungieren somit wie ein selektiver transmembraner Transporter für ML10. Die bereits beschriebene geringe Größe des Moleküls und sein amphipathischer Charakter führen zu einer vorteilhaften Dynamik im Organismus, welche sich durch ein schnelles Auswaschen aus Organen und Zellen ohne Apoptose auszeichnet. Ebenfalls konnte eine sehr gute Plasmastabilität und ein gutes Sicherheits- und Biodistributionsprofil in Probanden nachgewiesen werden (79). ML10 wird hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden, mit einer biologischen Halbwertszeit von circa einer Stunde im Blut (72). Es liefert ein gutes Target-to-Background-Verhältnis und eine geringe unspezifische Anreicherung in Organen ohne Apoptose (75).

3.4.1. Bisherige Anwendung von [^{18}F]-ML10

Ausgehend von der Entwicklung über Zwischenstufen, konnten anfängliche Basisfragestellungen bezüglich des Verhaltens von ML10 in Zellmodellen geklärt werden (74), (76). Es konnte gezeigt werden, dass der Uptake 3 - 4 mal höher in apoptotischem Muskelgewebe im Vergleich zu gesundem ist (80). Ein mögliches Einsatzfeld findet sich im neuronalen Zelltod zum Beispiel im Zuge des akuten Hirninfarktes. Reshef et al. verwendeten 2008 ein murines Schlaganfallmodell. Durch die permanente Okklusion der *Arteria cerebri media* konnte ein Hirninfarkt

induziert und 24 Stunden später mittels [^{18}F]-ML10 gemessen werden. Hier wurde eine Clearance Halbwertszeit aus dem Blut von nur 23 Minuten beschrieben. Es konnte eine gute Anreicherung im ischämischen Gebiet und keine Anreicherung in gesundem Gewebe und somit eine gute Eignung von [^{18}F]-ML10 zur nicht-invasiven PET-Bildgebung in diesem Feld gezeigt werden (81). Aus kardiologischem Interesse wurden in Kaninchen atherosklerotische Plaques in der Aorta induziert. Mittels [^{18}F]-ML10 konnte in der PET-Bildgebung die entstehende Apoptose gemessen werden. Die Lokalisation von [^{18}F]-ML10 wurde im Anschluss an die Messung autoradiographisch ex vivo, als innerhalb der Aortenwand befindlich verifiziert. Ein Vergleich fand in dieser Studie mit Kontrolltieren statt, wobei festgestellt wurde, dass die Anreicherung in Versuchstieren mit Plaques signifikant höher war. Ebenfalls ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Anreicherung in der Autoradiographie und der Anzahl an zugehörigen Zellen der histologisch untersuchten Bereiche. Zusammengefasst präsentierten Hyafil et al. [^{18}F]-ML10 in der PET-Bildgebung als gute Möglichkeit zur Messung der Apoptose bei atherosklerotischen Plaques (82). Simpson et al. entwickelten im Tiermodell ein kolorektales Tumor-Modell und konnten als Resultat einen erhöhten Uptake von [^{18}F]-ML10 in apoptotischen Tumorzellen feststellen (83).

In der Studie von Höglund et al. fand [^{18}F]-ML10 2011 zum ersten Mal Einsatz im Menschen (79). Hier konnte in acht gesunden Probanden mittels PET/CT die Aufnahme, Verteilung und Clearance sowie die Halbwertszeit des Tracers im Blut beschrieben werden. Es zeigte sich eine hohe Stabilität, wobei der Tracer 150 Minuten nach Injektion zu 97,5 % in seiner Struktur erhalten blieb (79).

In der Onkologie stößt die Bildgebung des Zelltodes auf großes Interesse, besonders hinsichtlich der Bewertung der individuellen Wirksamkeit einer kostenintensiven Tumorthherapie (21). Nicht immer zeigt eine Therapie, bei zusätzlich möglichen Nebenwirkungen, den gewünschten Therapieeffekt. Es gilt hier die bisherige Möglichkeit der morphologischen Tumor- und somit Therapiebewertung, zwei bis drei Monate nach Therapie mittels Magnetresonanztomographie, durch die zeitnahe Bewertung gewünschter Apoptose zum Beispiel durch [^{18}F]-ML10 möglicherweise zu ergänzen (22), (84), (85). Entsprechend konnte die Whole Brain Radiation Therapy (WBRT) von zehn Patienten mit Gehirnmetastasen in einer frühen Behandlungsphase mittels

Baseline PET-Messung per [^{18}F]-ML10 in Vergleich zur 6 - 8 Wochen späteren Follow-up MRT-Bildgebung gesetzt werden (78). Hier ergab sich eine signifikante Korrelation der beiden Messmethoden ($r = 0.9$). Auf dieser Grundlage zeigten 2014 Oborski et al. das Verhalten und Therapieansprechen im Fallbericht eines *Glioblastoma multiforme* hinsichtlich der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 in der PET-Bildgebung (86). Es wurde vor Therapiebeginn eine Baseline Messung mit [^{18}F]-ML10 in der PET-Bildgebung und anschließender MRT-Messung durchgeführt. Diese Messungen wurden dann 2 - 3 Wochen nach Therapiebeginn wiederholt. Es zeigte sich zur Baseline Messung erwartungsgemäß die höchste Konzentration von ML10 im Zentrum des Tumors, was am Ehesten auf zentralen Zelluntergang auf Grund schlechter Versorgung bei schnellem Tumorwachstum zurückzuführen war. Ebenfalls zeigte sich wie erwartet eine erhöhte Anreicherung in der Peripherie des Tumors nach Therapiebeginn, was auf eine vermehrte postradiogene Apoptose als Zeichen des Therapieansprechens hindeutet. Im Anschluss an den Fallbericht führten Oborski et al. eine Studie mit sechs Patienten ebenfalls mit *Glioblastoma multiforme* nach demselben Schema durch. Auch hier konnte eine Übereinstimmung der PET- und MRT-Bildgebung hinsichtlich der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 und der Tumorlokalisation sowie ein Anstieg der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 nach Therapiebeginn in der zweiten Messung festgestellt werden (87). Oborski et al. konnten darstellen, dass [^{18}F]-ML10 als prognostischer Marker nach Radiotherapie angewendet und eine starke Zunahme der Anreicherung, im Sinne einer vermehrten Apoptose, als Zeichen des Therapieansprechens gewertet werden kann.

Aktuell findet sich noch keine standardisierte Anwendung in der klinischen Therapieevaluation, jedoch trifft [^{18}F]-ML10 zunehmend auf wissenschaftliches Interesse als prognostischer Marker zur Abschätzung der Apoptose (88).

4. Autoradiographie

Radioaktiv markiertes Gewebe kann durch die beim Zerfall entstehende ionisierende Strahlung ex vivo bildlich dargestellt werden. Zur Erzeugung dieser autoradiographischen Bilder bieten sich verschiedene Möglichkeiten, beschrieben wird das in dieser Studie verwendete Kontaktverfahren (89). Für die Herstellung fertigt man dünne Gewebeschnitte auf Objektträgern an und positioniert diese auf einer Imaging Platte. Während der Zeit der Schwärzung befinden sich die Schnitte und die Imaging Platte in einer verschlossenen, abschirmenden Kassette. Dadurch wird Strahlung von außen minimiert (90). Durch die photographisch sensible Oberfläche der Imaging Platte entsteht so ein individuelles Autoradiogramm, welches die Verteilung des Radionuklides im Objekt widerspiegelt. Dünne Gewebeschnitte in Kombination mit weichen Betastrahlern, eine sehr hohe Auflösung der Imaging Platte und fehlendes angrenzendes Gewebe mit weiterer Anreicherung wie es in vivo vorhanden wäre, ergeben hierbei eine gute Auflösung (ca. 10 – 50 μm) (91).

5. Tiermodell

5.1. In vivo Apoptosedetektion nach Myokardinfarkt im Mausmodell

Vor der Durchführung eines Tierversuchs ist dem deutschen Tierschutzgesetz von 2006 §7 folgend deren Unerlässlichkeit am Stand der wissenschaftlichen Kenntnis zu prüfen.

Der Mausstamm C57BL/6N im Modell der akuten ischämischen Kardiomyopathie, mit permanenter sowie transienter Schädigung, stellt ein etabliertes Modell in der Forschung dar (92). Es zeigt sich eine hohe Reproduzierbarkeit des gewünschten Infarktbereichs in der linken Herzwand durch manuellen Verschluss des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) (93). Die Versuchstiere sollen sich zur Minimierung der experimentell bedingten Varianz im selben Alter befinden. Es können sich allein durch das unterschiedliche Alter, im Hinblick auf das kardiologische Tiermodell, verschiedene Infarktgrößen ergeben. Zyklusbedingt ergeben sich bei weiblichen Versuchstieren hormonelle Einflüsse, sodass zur Vermeidung dieser im kardiologischen Modell ausschließlich männliche Tiere verwendet werden sollen (94). Ausgehend von der Limitation des Herzens als Organ mit einer begrenzten Kapazität zur Regeneration und Reparatur und einer speziellen Physiologie, ergibt sich nicht die Möglichkeit der Beurteilung von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 im Zellkulturmodell. Die einzigartigen Bedingungen im Herzen, besonders im Anschluss an einen akuten Myokardinfarkt, können nicht entsprechend in einer Zellkultur nachgestellt werden. Basisforschung in Zellkulturen bezüglich der Spezifität und Sensitivität von ML10 hinsichtlich apoptotischer Zellen wurden bereits durchgeführt und fragen jetzt nach weiterführender Darstellung (76), (75). Allgemein und hinsichtlich der kardiologischen Pathophysiologie ist die in vivo Quantifizierung der Apoptose und die Unterscheidung der Apoptose in Bezug auf andere Zelltodformen bisher nicht möglich (6), (72). Das Maß der Apoptose im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt stellt einen interessanten Faktor in der Krankheits- und Therapieevaluation dar. Nach heutigem wissenschaftlichem Stand gibt es keine Alternative zum Tiermodell zur Etablierung eines neuen Tracers zur in vivo Darstellung der postischämischen myokardialen Apoptose.

6. Tiermedizinische Relevanz

Baldauf schrieb bereits 2013: „Regionale myokardiale Ischämie kann bei jeder Kardiomyopathieform auftreten“ (31). Atherosklerose und damit verbundene ischämische Myokarderkrankungen sind eher selten beim Tier, jedoch könnte das Vorkommen prinzipiell unterschätzt werden (7). In verschiedenen Fallstudien bei Hund und Katze, bezüglich akuter und subakuter myokardialer Infarkte, konnte ein Zusammenhang zu anderen Grunderkrankungen festgestellt werden. Myokardiale Infarkte leisten hierbei möglicherweise einen Beitrag zur Morbidität sowie zur Mortalität (8), (95), (96). Die verschiedenen Grunderkrankungen, zum einen kongenital, zum anderen erworben, können bei Tieren wie auch beim Menschen zu einem Remodeling des Herzens führen. Ein Umbau wird zumeist von Hypertrophie des Myokards und verschiedenen Formen des Zelltodes begleitet. Durch die Erkrankung des Herzmuskels kommt es auch beim Tier zur erhöhten Belastung des Myokards, welche den Umbauprozess weiter anregt. Es kann primär oder nach Ischämie sekundär eine Inflammation entstehen, welche ebenfalls den Prozess weiter anregt (97). Nach demselben Prinzip wie im menschlichen Herzen sind biomechanische, neurohumorale Signale und Zytokine Vermittler des Remodelings. Zunächst kompensatorisch, fördert dieser Umbau schließlich weiteren Zelltod. Insbesondere wird apoptotischer Zelltod gefördert bis hin zum chronischen Herzversagen, welches letztlich zum Tod des Patienten führt (98). Das umfassende Verständnis pathophysiologischer Mechanismen primärer oder auch sekundärer kardiovaskulärer Erkrankungen sollte hier im Fokus stehen. Daher bildet das Erkennen der Apoptose mittels Tracer spezifisch für diese unter anderem die Möglichkeit des Begreifens der Vorgänge im Herzmuskelgewebe bei verschiedenen Grunderkrankungen sowie dem akuten Myokardinfarkt. Das Wissen um das Maß der Apoptose und deren Anteil an der akuten Ischämie sowie längerfristig am Remodeling bietet die Möglichkeit der Evaluierung verschiedener Therapeutika. Der Erhalt apoptotischer Zellen sowie Bereiche des „myocardium at risk“ im Verlauf dieser Erkrankungen, sollte in der kardiologischen Forschung berücksichtigt werden. Das Ziel ist die Lebensqualität und Lebensdauer zu verbessern.

III. ZIELSETZUNG

In dieser Studie soll die Frühphase des myokardialen Zellunterganges untersucht werden. Bislang ist die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs und des Ausmaßes der Apoptose nach akutem Myokardinfarkt in vivo nicht möglich, jedoch bieten sich gerade hier Möglichkeiten der Intervention. Beispielsweise findet sich nach erfolgreicher Reperfusion auf Grund der wiederhergestellten Energiezufuhr im gesamten Infarktbereich vorwiegend Apoptose (36). Hier konnte bereits gezeigt werden, dass der entstandene Schaden durch die Reperfusion prinzipiell beeinflussbar ist. Ein Eingriff in den Mechanismus der Apoptose nach Myokardinfarkt bildet daher einen Ansatzpunkt, um Zelltod von den differenzierten, nicht ersetzbaren Myokardiozyten nach zügig erfolgter Reperfusion zu verhindern (17). Innerhalb der ersten 48 Stunden soll das Maß der Apoptose sowohl nach permanenter Ischämie sowie nach erfolgter Reperfusion im transienten Ischämie-Modell gemessen werden. Dabei soll die Nutzung des [^{18}F]-Fluor-markierten Tracers ML10 zur Messung myokardialer Apoptose diskutiert und eine mögliche Aussage bezüglich des Zeitpunktes mit der höchsten Anreicherung und somit dem höchsten Maß an Apoptose im jeweiligen Ischämie-Modell getroffen werden. Zudem soll die mögliche Verwendbarkeit der Zeitpunkte hinsichtlich weiterer Erforschung der myokardialen Apoptose im jeweiligen Modell evaluiert werden. Die Anreicherung soll mittels μPET in vivo quantifiziert werden. Als hochauflösendes Vergleichsverfahren soll die Methode der Autoradiographie ex vivo herangezogen werden.

Daraus ergeben sich für diese Arbeit zu beantwortende Fragestellungen:

Ist es möglich mittels [^{18}F]-ML10 nach akutem Myokardinfarkt Apoptose darzustellen?

Zu welchem Zeitpunkt ergibt sich die höchste Anreicherung von [^{18}F]-ML10 und somit das höchste Maß der Apoptose im jeweiligen Modell der permanenten und transienten Ischämie?

Welcher der untersuchten Zeitpunkte erscheint hinsichtlich myokardialer Apoptose im permanenten sowie im transienten Ischämie-Modell am ehesten als stabil und geeignet als Referenz für weitere Studien?

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Verwendete Medikamente und Tracer in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Buprenorphin (Buprenovet®)	Bayer-Vital, Leverkusen
Dexpanthenol 5 % (Bepanthen Augensalbe®)	Bayer-Vital, Leverkusen
Fentanyl (Fentanyl®-Janssen) 0,05 mg/ml	Janssen-Cilag, Neuss
Isofluran (Isofluran CP®) 1 ml/ml	CP-Pharma, Burgdorf
Medetomidin (Domitor) 1 mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Meloxicam (Metacam®) 2 mg/ml	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Midazolam (MIDAZolam) 1 mg/ml	B Braun, Melsungen
Povidon-Jod (Braunol®) 7,5 %	B Braun, Melsungen
[¹⁸ F]-2-Fluor-2-Deoxy-D-Glucose	AAA Germany GmbH, München
[¹⁸ F]-2-(5-fluoro-pentyl)-2-methylmalonate- Precursor	Chemscene, New Jersey, USA

1.2. Verwendetes Operationszubehör in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Beatmungsventilator, Minivent T845	Hugo Sachs Elektronik, Hegstetten
Chirurgisches Nahtmaterial: PROLENE® 8 - 0, Typ 8767H	Ethicon, Norderstedt

6 - 0, Typ EH7830H

VICRYL™:

6 - 0, Typ V134H

Durapore® – medizinische Pflaster: 1,25 cm und 2,5 cm	3M, Seefeld
Enthaarungscreme	Veet AG, Mannheim
Kanüle 30G, BD Microlance™3	Becton Dickinson, France
Leukoplast hospital®	BSN medical, Hamburg
Mikrochirurgische Schere	Roboz, Maryland, USA
Mikorchirurgische Pinzette	FST, Heidelberg
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Nadelhalter	FST, Heidelberg
Schutzhandschuhe Vasco OP eco	B Braun, Melsungen
Sterile Saugtupfer (Sugi®)	Kettenbach GmbH, Eschenburg
Temperature-Controll-Modul 0903	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim
Vaseline	Unilever, Hamburg
Wattestäbchen	NOBAmed, Wetter/Ruhr
Zellstofftupfer steril (Zellete®)	Lohmann&Rauscher, Rengsdorf

1.3. Verwendete Chemikalien und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Eindeckmedium (Entellan®)	E Merck, Darmstadt
Eosin G	Sigma-Aldrich, München

Essigsäure 99 % Eisessig	E Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100 %	Roth, Karlsruhe
wässrige Formaldehydlösung 4 %, neutralgepuffert (pH 7,0)	E Merck, Darmstadt
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	E Merck, Darmstadt
Mayers Hämaunlösung	E Merck, Darmstadt
Methylgrün (42590)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid Lösung Isoton 0,9 %	Fresenius, Bad Homburg
Natriumhydroxid, NaOH	Sigma-Aldrich, München
Paraffinöl	Roth, Karlsruhe
PBS 0,01 M	E Merck, Darmstadt
Phosphatpuffer 0,4 M	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure, HCl	E Merck, Darmstadt
TUNEL-KIT, ApopTag® S7100	Millipore, Temecula, USA
Xylol	E Merck, Darmstadt
2-Propanol	E Merck, Darmstadt

1.4. Verwendetes Zubehör der μ PET-Messung und Autoradiographie in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
μ PET-Scanner, Inveon P120	Siemens, München
Analysenwaage, Typ CP 224S	Sartorius, Göttingen

Dosimeter- Ring	AWST, Helmholtz Zentrum München
Filmdosimeter	AWST, Helmholtz Zentrum München
Folienscanner HD-CR 35 NDT	Dürr-NDT, Bietigheim-Bissingen
Gefriermikrotom, Kryostat Typ CM1510	Leica, Nussloch
Imaging Plate Fujifilm MS	Fujifilm Europe, Düsseldorf
Imaging Kasette Fujifilm BAS Cassette 2 2025	Fujifilm Europe, Düsseldorf
Narkosegerät, Isofluran Vet.Med.Vapor	Drägerwerk, Lübeck
Objektträger, Super Ultra Plus®	Thermo Scientific, Braunschweig
Operationsmikroskop, Typ Stemi DV4 Spot	Zeiss, Jena
Präzisionswaage, Typ 440-49N	Kern, Balingen
Tissue-Tek® Cryomold Intermediate	Sakura, CA. USA
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Gefriermedium	Sakura, CA. USA
Wärmematte ThermoLux®	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt

1.5. Verwendete Software in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Advanced Image Data Analyzer	Raytest, Straubenhardt
Axio Vision SE64 Version 4.9	Zeiss, Jena
Inveon Research Workplace Version 4.1	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA

Inveon Acquisition Workplace Version 1.5.0.28	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA
Mikrosoft Windows 10	Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA
SPPS PASW Statisticus Version 25	SPSS, Chicago, USA

1.6. Verwendetes Zubehör Histologie und Immunhistochemie in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Ausgießstation, TBS 88 Paraffin Embedding	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Einbetttschälchen, Supra-Mega 60 x 45 x 15 mm	Engelbrecht, Edermünde
Einbettungssautomat, Autotechnikon Histomaster 2050/Di	Bavimed, Birkendorf
Histologische Kassette Acetal Simport™	Fischer Scientific, Schwerte
Kühlplatte KryofixK	Bachofer, Reutlingen
Rotationsmikrotom, HM 315	microTec Laborgeräte GmbH, Walldorf
Mikroskop Primo Star mit PhotokameraAxiocam 105 color	Zeiss, Jena
Wasserbad SP-EL	Daglef Patz, Wankendorf

1.7. Verwendete sonstige Geräte und Materialien in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav Varioklav Dampfsterilisation	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Untersuchungshandschuhe Peha-soft	Hartmann, Heidenheim
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen

2. Methoden

2.1. Tiermodell

In dieser Studie vorgenommene Tierexperimente wurden im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchs mit dem Aktenzeichen ROB-55.2Vet-2532.Vet_02-15-241 durchgeführt.

2.1.1. Versuchstiere und Haltung

Die Versuchstiere wurden im Tierstall der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München gehalten. Die verwendeten männlichen Mäuse des Stammes C57BL/6N wurden aus einer spezifisch pathogenfreien Zucht (Fa. Charles River, Sulzfeld) bezogen und im IVC-System (Individually Ventilated Cages) in einem Käfig Typ III „Blueline“ zu je vier Tieren gehalten. Bei Ankunft betrug das Alter der Mäuse zwischen sieben und neun Wochen. Den Tieren wurde eine Adaptionszeit von mindestens sieben Tagen vor Versuchsbeginn gewährt. Zum Versuchsbeginn betrug das Alter der Tiere einheitlich zehn Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 19 bis 26 Gramm.

Die relative Luftfeuchtigkeit betrug fortlaufend circa 50 % und die Temperatur 23 ± 1 °C, wobei die Parameter einer täglichen Kontrolle unterlagen. Um eine zirkadiane Rhythmik zu gewährleisten, wurde durch ein Lichtsystem ein fester 12 h hell / 12 h dunkel Wechsel durchgeführt. Während des gesamten Aufenthalts bestand ad libitum Zugang zu Leitungswasser sowie standardisiertem Alleinfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Weichholzgranulat (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) diente als Einstreu. Als Enrichment wurden rote Maushäuser, rote Mausrollen und Iglus (Techniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) sowie Nestbaumaterial (Nestlets, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) verwendet. Nach FELASA-Empfehlung erfolgte eine wöchentliche Reinigung des Tierstalles sowie ein Umsetzen der Tiere in neue Käfige wobei Wasser und Futter ebenfalls erneuert wurden. Eine dirty-bedding Sentinelhaltung mit ¼ - jährlicher Einsendung zur Hygienekontrolle sowie regelmäßige Probennahme in allen Räumlichkeiten der

Versuchstierhaltung fand an Hand FELASA-Richtlinien statt.

Der Erreger *Chilomastix bettencourti* wurde ein Quartal lang in der Tierhaltung nachgewiesen, es handelt sich hierbei um darmständige, nichtpathogene Protozoen, welche die Versuchsergebnisse nicht beeinflussen.

2.2. Infarktmodell

2.2.1. Modell der permanenten Ischämie

Zur Induktion eines Herzinfarktes des linken Ventrikels wurde der *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) (englisch: Left anterior descending coronary artery (LAD)) ligiert. Die Okklusion führt zu einer Infarzierung des linksventrikulären Myokards (siehe Abbildung 5) (99).

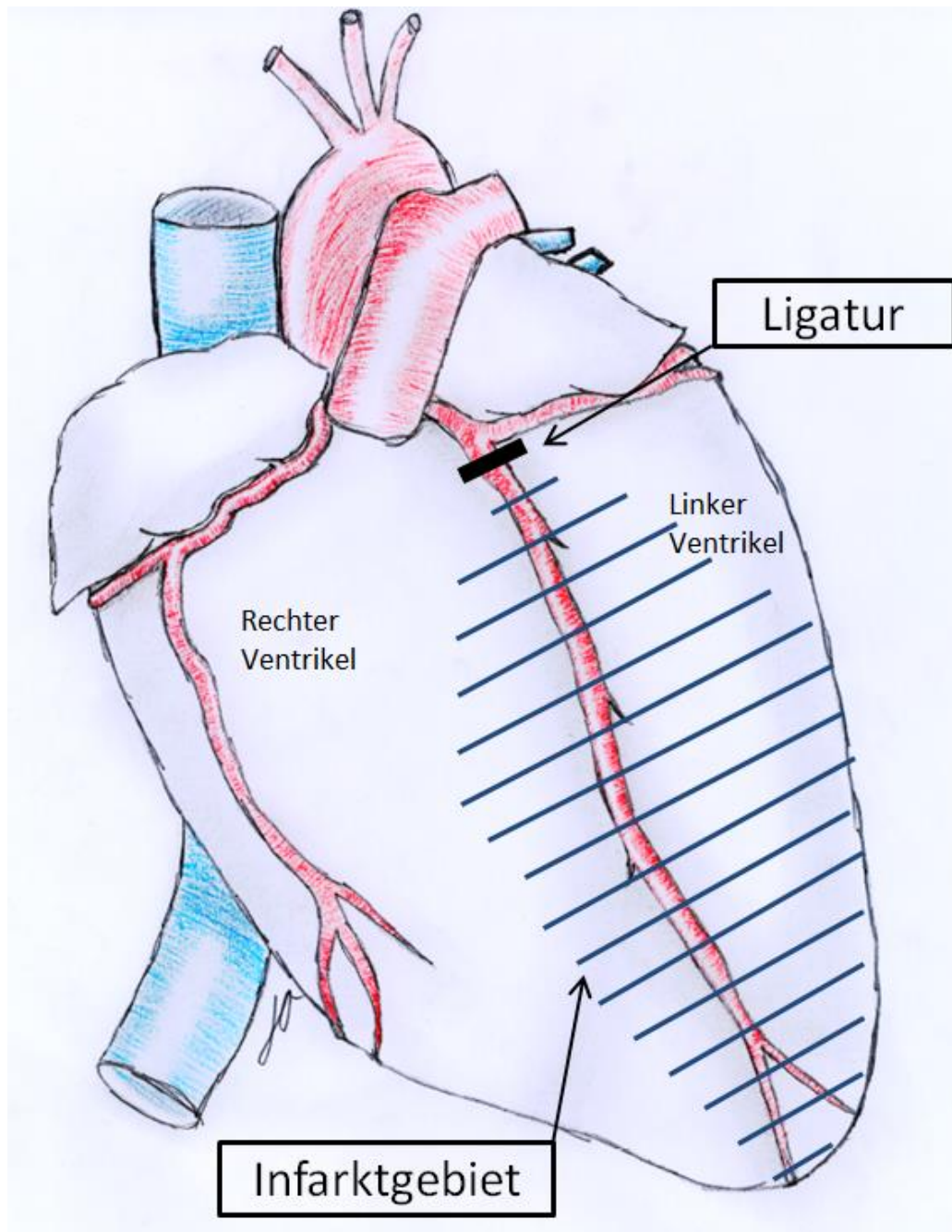


Abbildung 5: Beispielhaftes Infarktgebiet des *Ramus interventricularis anterior* (Skizze Jessica Olivier).

Zunächst wurde das Versuchstier, nach Gewichtsfeststellung, durch intraperitoneale Gabe von MMF (Medetomidin 0,5 mg/kg, Midazolam 5,0 mg/kg, Fentanyl 0,05 mg/kg) in Narkose gelegt (100). Diese Art der Narkose ist vollständig antagonisierbar und bietet den Vorteil des zügigen Erwachens nach der Beendigung der Operation. Das Entnehmen der Maus aus dem Heimatkäfig, sowie das Handling der Tiere erfolgten im Zeitabstand von mindestens 20 Minuten zur Narkose, um den Stresseinfluss gering zu halten. Nach der Wartezeit wurde die Maus auf eine Wärmematte mit dauerhafter Temperaturüberwachung per Analsonde transferiert, wobei die Temperatur konstant bei circa 37 °C gehalten wurde. Um ein Verrutschen zu verhindern, wurden die Gliedmaßen atraumatisch mit Leukoplaststreifen und der Unterkiefer mittels Gummiband fixiert. Zum Schutz der Augen wurde auf diese Bepanthen® Augensalbe aufgetragen. Zur Vorbereitung der nachfolgenden Thorakotomie wurde ein circa 1 cm großes Areal im Bereich des linken Brustkorbes und ebenso die vordere Halsseite, mit Hilfe von Enthaarungscreme vom Fell befreit.

Nach Desinfektion mittels Braunol® wurde, um eine ausreichende Narkosetiefe sicher zu stellen, der Zwischenzehenreflex des narkotisierten Tieres geprüft. Dies fand auch während der Operation wiederholt statt, um rechtzeitig eine erforderliche Nachdosierung der Narkose erkennen zu können. Von der Injektion bis zur Durchführung vergingen mindestens 10 Minuten, um eine gute Verteilung der Wirkstoffe und die nötige chirurgische Toleranz zu erhalten.

Zur Intubation wurde der Kehlkopf und die Luftröhre per medianem Hautschnitt freigelegt, wobei das darüber befindliche Gewebe der Schilddrüse stumpf mit einer anatomischen Pinzette präpariert wurde. Der an dem Beatmungssystem Mini Vent (Hugo Sachs Elektronik, Hegstetten) befindliche Tubus (19 Gauche) wurde in der Luftröhre platziert und der Hautschnitt per fortlaufender Naht mit einem Faden (5-0 Ethibond) geschlossen (siehe Abbildung 6) (101). Die Maus wurde während der Operation mit einem Atemzugvolumen von 150 µl und 110 Atemzügen/min beatmet.

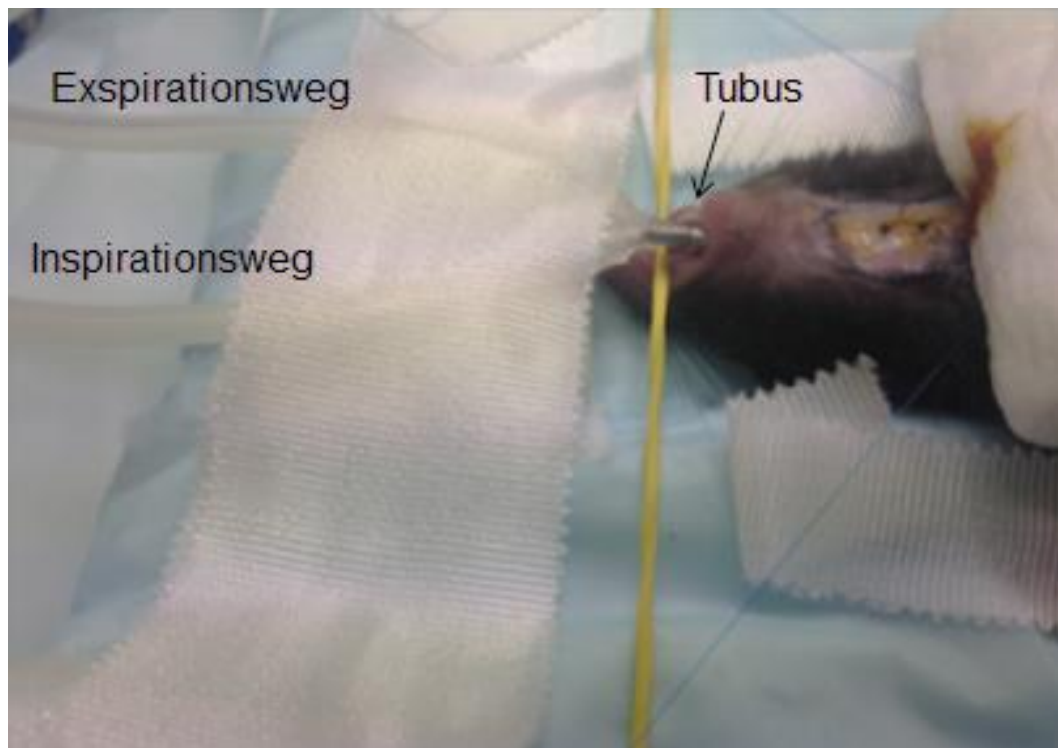


Abbildung 6: Maus nach erfolgreicher Intubation (Beispiel aus dieser Studie).

Um links den zweiten Interkostalraum (ICR) zur Ligatur am Herzen freizulegen, folgte ein Hautschnitt (circa 1 cm Länge) auf dem in Rückenlage höchsten Punkt des Brustkorbes, welcher der Lage des zweiten Interkostalraums entspricht. Anschließend wurden der *Musculus pectoralis major* und der *Musculus pectoralis minor* durchtrennt (siehe Abbildung 7). Dabei waren medial die *Rami perforantes arteriae thoracicae internae* zu schonen.



Abbildung 7: Maus in der Narkosesituation mit eröffneter Brustmuskulatur oberhalb des zweiten Interkostalraumes (ICR).

Durch Anheben der zweiten Rippe mittels anatomischer Pinzette wurde das Eröffnen des zweiten Interkostalraumes, im *Musculus intercostalis* mit einer mikrochirurgischen Schere, erleichtert und ein Verletzen der im Brustkorb befindlichen Organe verhindert. Medial war auf die *Arteria* und *Vena thoracica interna sinistra* sowie die daraus entspringenden *Arteriae intercostales ventrales* zu achten und diese nicht zu schädigen. Weiter wurde die zweite und dritte Rippe mit jeweils einem Haltefaden umstochen, welcher per Leukoplaststreifen auf der Unterlage befestigt wurde.

Dies ermöglichte ein Erweitern des Interkostalraumes. Das Perikard wurde stumpf eröffnet und lateral mit Hilfe eines sterilen Saugtupfers fixiert, um die exponierte Lunge zu schützen. Der *Ramus interventricularis anterior* wurde kurz unterhalb des *Auricula cordis sinistra* mit einem Faden (8-0 Prolene) intramyokardial umstochen und ligiert (siehe Abbildung 8).

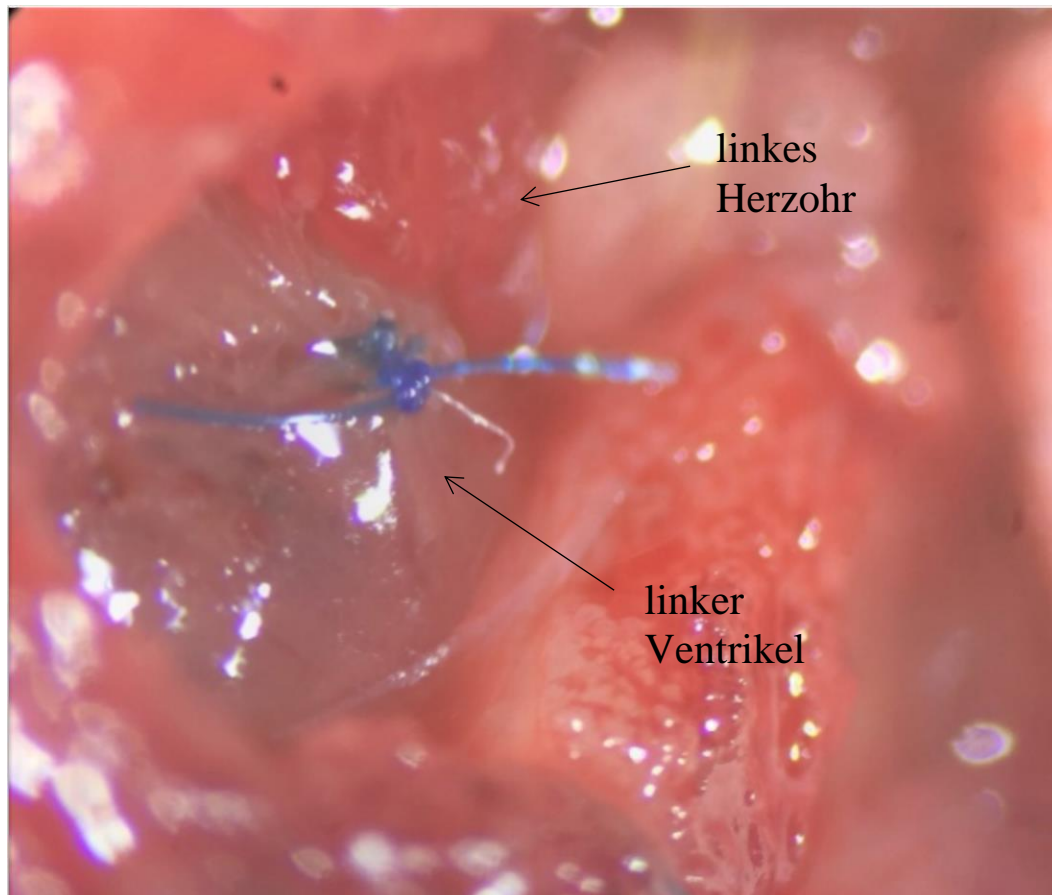


Abbildung 8: Herz mit gesetzter permanenter Ligatur des *Ramus interventricularis anterior*.

Durch die unterbrochene Blutzufuhr erfolgte ein sichtbares Abblassen des distal der Ligatur gelegenen Herzmuskels, welches allgemein als Kriterium einer erfolgreichen Operation angesehen wird. Der Interkostalspalt wurde anschließend sorgfältig durch Einzelhefte luftdicht verschlossen. Mit einem Faden (6-0 Ethibond) wurde sowohl die Muskulatur in Einzelheften als auch die Haut in fortlaufender Naht verschlossen. Zwanzig Minuten vor Beendigung der Operation erhielt das Tier die dem zu Beginn ermittelten Körpergewicht entsprechende

Menge 0,1 mg/kg Buprenovet® (0,3 mg/ml) subkutan. Zur Desinfektion wurde die Hautwunde abschließend mit Braunol® bedeckt. Das Versuchstier erhielt entsprechend der verabreichten Dosierung der Narkose die kombinierte Antagonisierung subkutan, bestehend aus 2,5 mg/kg Atipamezol und 0,5 mg/kg Flumazenil. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Fentanyl und der bereits hohen Volumenbelastung der Tiere wurde auf die Gabe von Naloxon verzichtet. Die Maus wurde extubiert und in Bauchlage gelegt, sobald der Zwischenzehenreflex wieder auslösbar war. Die Operation nahm circa 30 – 40 Minuten in Anspruch.

Die Maus wurde in einen auf einer Wärmematte befindlichen Käfig mit Nestbaumaterial verbracht und verblieb dort bis zum vollständigen Erholen von der Narkose. Es standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

2.2.2. Modell der transienten Ischämie

Das Operationsmodell der transienten Ischämie unterscheidet sich in der Durchführung nur geringfügig von dem der permanenten Ischämie (102). Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch für dieses Operationsmodell findet sich häufig die Bezeichnung Ischämie/Reperfusion (I/R).

Der Ablauf bis zur Infarktinduktion war entsprechend dem Modell der permanenten Ischämie. Der *Ramus interventricularis anterior* wurde ebenfalls mit einem Faden (8-0 Prolene) intramyokardial umstochen. Dabei wurde zusätzlich ein Staukörper bestehend aus einer Kanülenspitze (30G) ummantelt von einem Polyethylentubus in die Ligatur eingefügt, bevor diese festgezogen wurde (siehe Abbildung 9). Es erfolgte ebenso wie im Modell der permanenten Ischämie ein sichtbares Abblassen des Herzmuskels aufgrund der unterbrochenen Blutversorgung. Für 30 Minuten wurde die Ligatur so belassen und zum Schutz des Gewebes vor Austrocknung wurde ein mit NaCl-Lösung befeuchteter, steriler Zellstofftupfer über den offenen Thorax gelegt. Die Fadenzügel zum Aufspannen des Interkostalraumes wurden gelockert. Nach Ablauf der Zeit konnte der Staukörper mittels anatomischer, mikrochirurgischer Pinzette entnommen und die Ligatur so wieder durchtrennt werden.

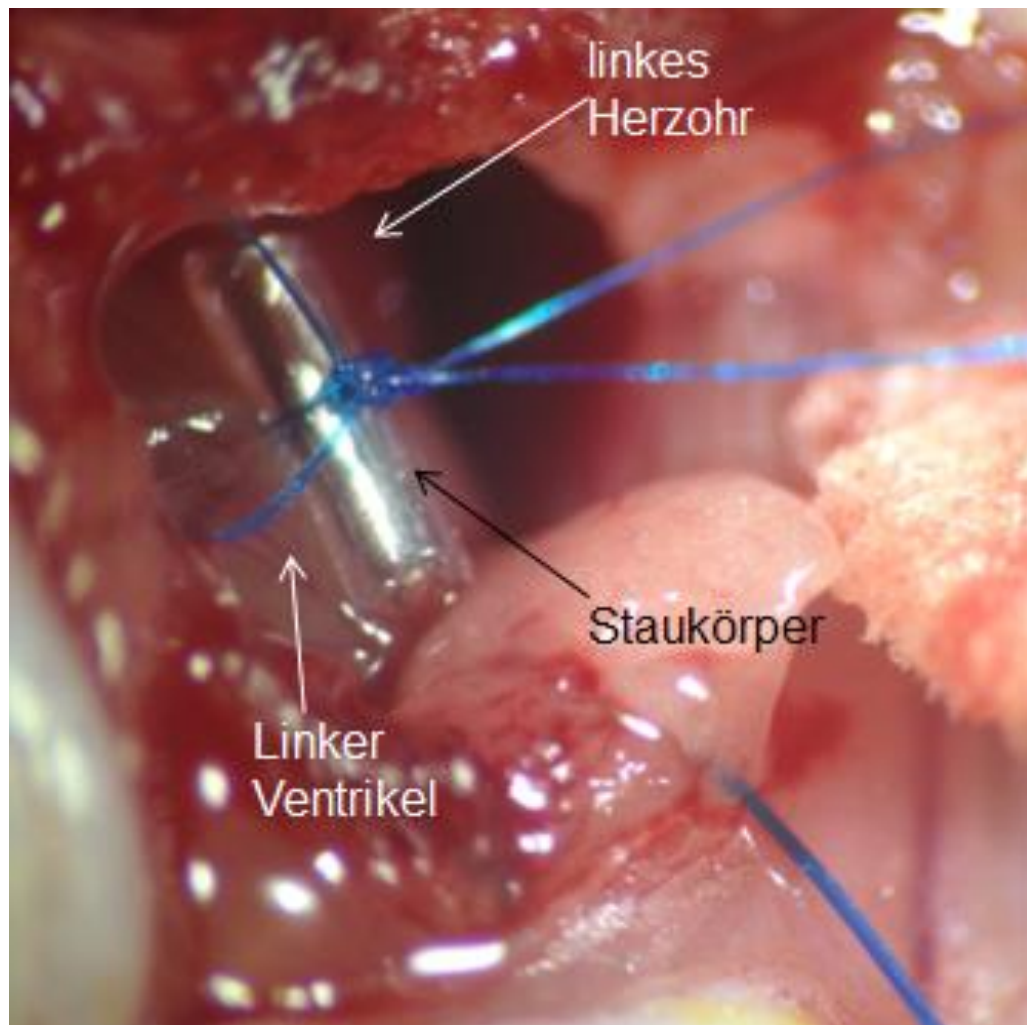


Abbildung 9: Herz mit gesetzter transienter Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* und gelockerten Fadenzügeln.

Das zuvor ischämische Gewebe wurde anschließend, entsprechend einer Reperfusionstherapie, wieder durchblutet. Der weitere Ablauf war entsprechend dem Operationsmodell der permanenten Ischämie.

2.2.3. Schmerztherapie

Die postoperative Analgesie während der gesamten Versuchsdauer umfasste eine zweimal tägliche Gabe Buprenorphin (0,1 mg/kg s.c.) in Kombination mit einer einmal täglichen Gabe Meloxicam (1 mg/kg s.c.). Intraoperativ erhielt das Tier die erste Injektion Buprenorphin zwanzig Minuten vor Erwachen, um eine ausreichende Anflutungszeit zu gewährleisten.

2.3. Allgemeiner Versuchsaufbau

In dem jeweiligen OP-Modell der permanenten und transienten Ischämie wurde bei den verwendeten Mäusen ein Myokardinfarkt induziert, wobei die Ligatur im Modell der permanenten Ischämie belassen und im Modell der transienten Ischämie nach einem Zeitraum von 30 Minuten wieder eröffnet wurde. Im Anschluss an die Operation erfolgte je Tier zu einem der Zeitpunkte die [^{18}F]-ML10 Injektion. Vor und nach der Injektion wurde die in der Spritze befindliche Aktivitätsmenge bestimmt, um die genaue injizierte Dosis berechnen zu können

Insgesamt standen 63 Tiere für die μPET -Messung zur Verfügung, jeweils 31 Tiere für die permanente Ischämie sowie 32 Tiere für die transiente Ischämie. Für die Autoradiographie standen 29 Tiere zur Verfügung, 14 Tiere für die permanente sowie 15 Tiere für die transiente Ischämie. Im Anschluss an die Operation wurde den Versuchstieren zu einem der Zeitpunkte I (2 h), II (4 h), III (6 h), IV (24 h) oder V (48 h) [^{18}F]-ML10 injiziert (siehe Abbildung 10).

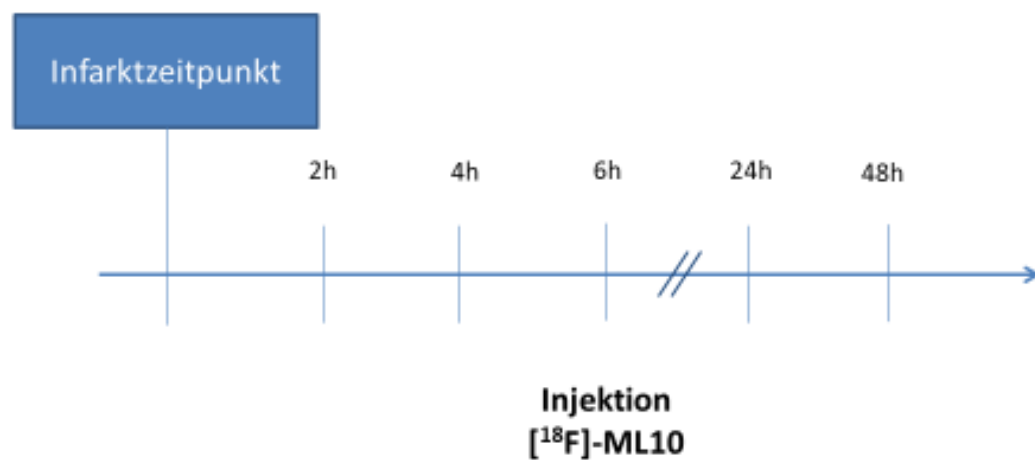


Abbildung 10: Darstellung der Zeitpunkte der Injektion von [^{18}F]-ML10 nach Infarktinduktion.

Danach wurden die Tiere entweder im μPET gemessen oder für die Autoradiographie euthanasiert (siehe Abbildung 11). Um die Ergebnisse der μPET Messung und der Autoradiographie vergleichen zu können, wurden in der μPET -Messung Daten von Minute 120 bis 150 akquiriert und auf die Mitte des Scans zerfallskorrigiert (135 min p.i.).

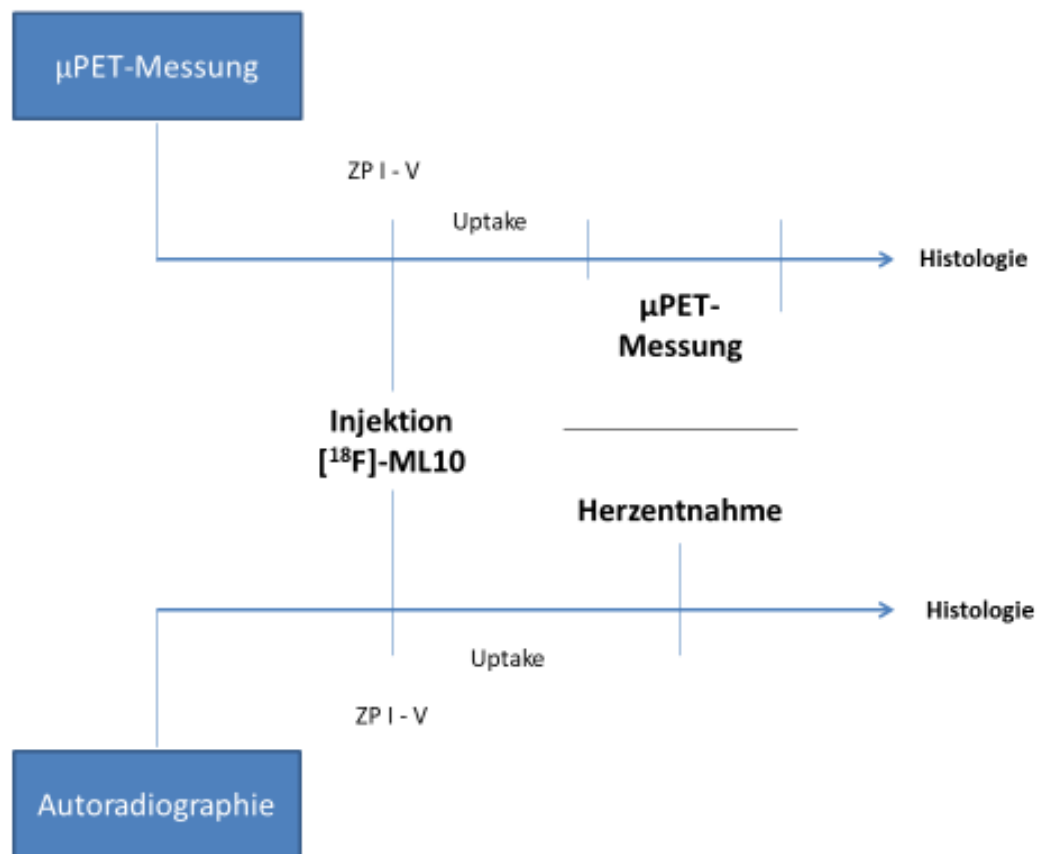


Abbildung 11: Darstellung der Untersuchungen zu den fünf Zeitpunkten (ZP I–V) nach Infarkt.

Die Herzentnahme für die Autoradiographie erfolgte 135 Minuten nach Applikation des Tracers. Hierdurch sollte im Mittel ein gleicher Zeitraum und dadurch eine vergleichbare Biodistribution des [¹⁸F]-ML10 Tracers in beiden Messmethoden sichergestellt werden.

2.3.1. Versuchsaufbau der μ PET-Messung

Nach einer vordefinierten Uptake-Zeit (2 h p.i.) wurde die μ PET-Messung gestartet. Während der gesamten Messung befanden sich die Tiere in einer überwachten Inhalationsnarkose mit Isofluran. Zur Lagedarstellung der Organe des Tieres, der Lokalisation des Infarktgebietes und zur Co-Registrierung der Anreicherung des zuvor gemessenen [^{18}F]-ML10 fand im Anschluss eine [^{18}F]-FDG Messung statt. Daraufhin wurden die Tiere schmerzlos getötet und für die histologische Untersuchung vorbereitet (siehe Abbildung 12).

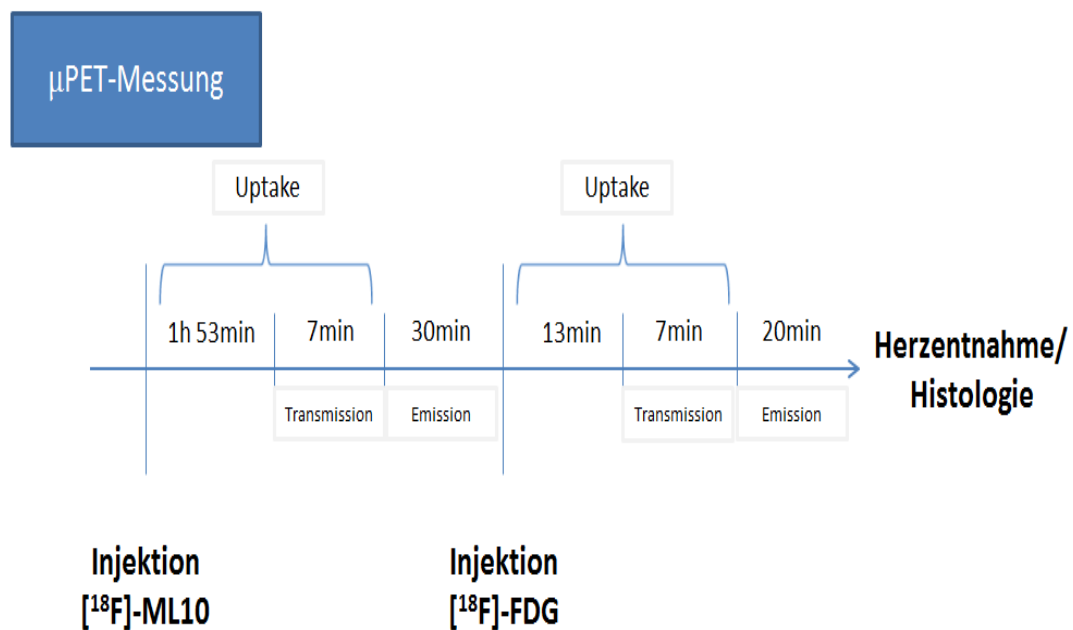


Abbildung 12: Darstellung des Ablaufs der μ PET-Messung.

2.3.2. Versuchsaufbau der Autoradiographie

Entsprechend zur Methode der μ PET Messung wurde ebenfalls der genaue Zeitpunkt der Infarkterzeugung festgehalten. Nach der vorbestimmten Anreicherungszeit wurden die Tiere getötet und die Herzen zur Verarbeitung für die Autoradiographie entnommen. Im Anschluss erfolgte die histologische Bearbeitung (siehe Abbildung 13).

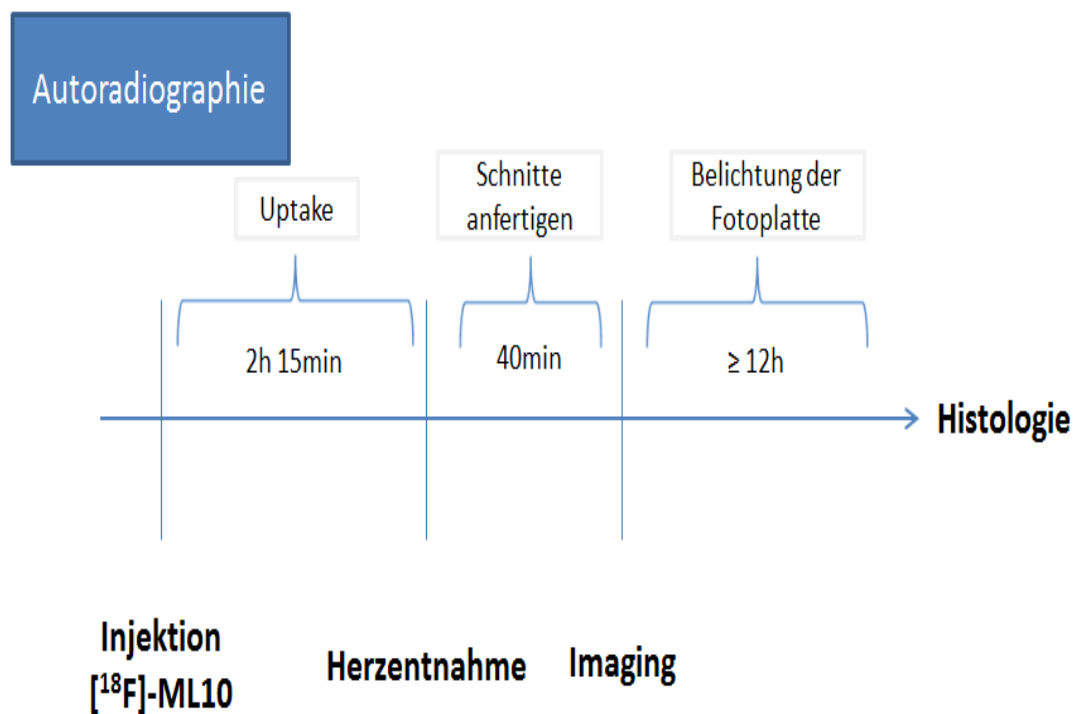


Abbildung 13: Darstellung des Ablaufs der Autoradiographie.

2.4. Bildgebung

2.4.1. Radiopharmaka

Im Zuge dieser Studie wurden die Radiopharmaka [^{18}F]-FDG und [^{18}F]-ML10 verwendet. Das für die Radiopharmaka benötigte Radionuklid Fluor-18 wurde im Zyklotron hergestellt. Die Synthese von [^{18}F]-ML10 wurde bereits durch Kadivel et al. und Sobrio et al. beschrieben und in Anlehnung an diese entsprechend im Radiopharmaziezentrum der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin in München, Großhadern durchgeführt (103), (104).

2.4.2. Herstellung [^{18}F]-ML10

Bei der Herstellung von [^{18}F]-ML10 handelt es sich um eine automatisierte Synthese auf einem Elysia-Raytest Synchrom Modul. Durchgeführt wurde die Synthese durch Mitarbeiter im Radiopharmaziezentrum der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin in München, Großhadern.

[^{18}F]-ML10 wurde aus einer Vorstufe (Precursor), welcher als ML10-Tosylat vorliegt und dem radioaktiven ^{18}F -Fluorid hergestellt. Radioaktives ^{18}F -Fluorid wurde mittels Beschusses von ^{18}O angereichertem Wasser mit beschleunigten Protonen in einem „GE-PET Trace800“-Zyklotron hergestellt:

1. Zunächst wurde in einer nukleophilen Substitution das am ML10 befindliche Tosylat durch [^{18}F]-Fluorid ersetzt.
2. Die Tertbutylschutzgruppen können nach erfolgreicher Bindung des [^{18}F]-Fluorids im Austausch mit Tosylat abgespalten werden. Die Abspaltung wurde mittels Salzsäurelösung durchgeführt und es entstand der Einsatzfähige [^{18}F]-ML10 Tracer (siehe Abbildung 14).

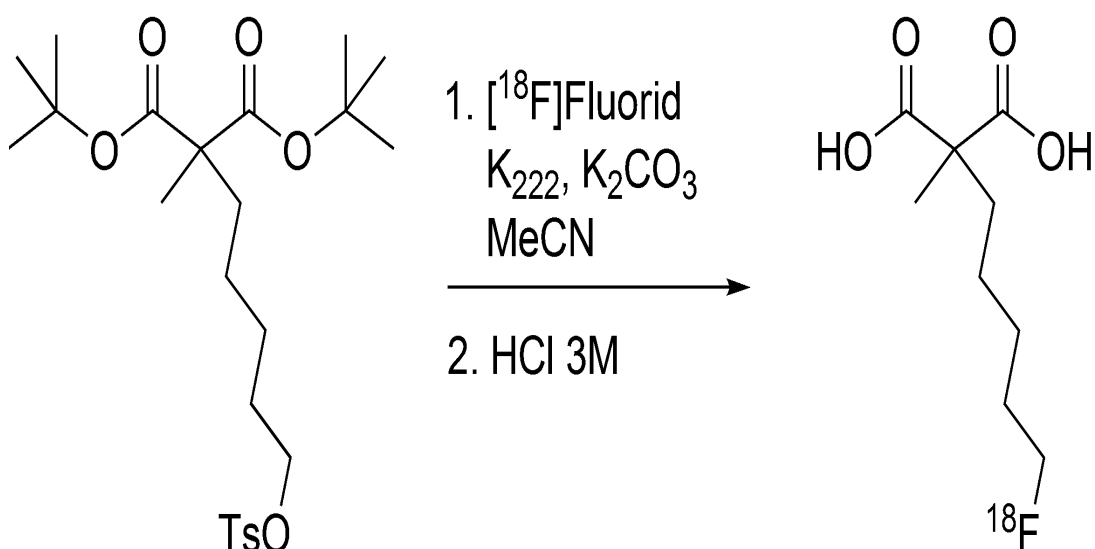


Abbildung 14: Herstellung [^{18}F]-ML10: 1. Ersatz des Tosylat durch [^{18}F]-Fluorid;
2. Abspaltung der Tertbutylgruppen. (Eigene Darstellung).

Die Synthese nahm im Durchschnitt 90 Minuten in Anspruch, die mittlere Ausbeute lag bei $10 \pm 4\%$ non-d.c. ($19 \pm 7\%$ d.c.) für $n = 15$ Synthesen. Für die spezifische Aktivität wird auf Sobrio et al. verwiesen, hier lag die spezifische Aktivität bei ca. $235 \pm 85 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (104).

2.5. Positronen-Emissions-Tomographie

2.5.1. Durchführung

Die zu messenden Tiere wurden aus dem Heimatkäfig entnommen und in einen auf einer Wärmematte platzierten Käfig gesetzt. Es stand Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Zur Injektion des Tracers wurden jeweils zwei operierte Tiere, welche parallel zu messen waren, aus dem Käfig entnommen. Sie wurden in eine rote Narkosebox verbracht, welche zur Einleitung der Inhalationsnarkose mit 2 % Isofluran bei einem flow von 2 Liter Sauerstoff pro Minute geflutet wurde. Zum Erhalt der im Normbereich befindlichen Körpertemperatur wurde die Box vorgewärmt und befand sich auf einer Wärmematte. Sobald die Tiere nach circa zehn Minuten bewegungslos waren und eine ruhige Atmung zeigten, wurden sie der Box entnommen. Der Erhalt der Narkose erfolgte per Nasenstück bei 1,5 % Isofluran und 2 Liter Sauerstoff pro Minute auf einer Wärmematte. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde Augensalbe auf diese aufgebracht. Der Zustand der Tiere während der Narkose wurde regelmäßig über Atmung und Körpertemperatur überwacht.

Den in Narkose befindlichen Tieren wurde nach Testen des ausgefallenen Zwischenzehenreflexes ca. 16 MBq des [^{18}F]-Fluorid markierten Tracers ML10 über eine der lateralen Schwanzvenen langsam mittels 30G Katheter appliziert. Das zu applizierende Volumen wurde standardisiert auf 150 μl mit 0,9 % NaCl-Lösung aufgefüllt und der Venenkatheter im Anschluss mit 50 μl NaCl-Lösung nachgespült. Somit wird ein Rückstand des Radiopharmakons minimiert und ein einheitlich appliziertes Volumen von 200 μl sichergestellt. Der verwendete Katheter sowie die Injektionsspritze des Tracers und die verwendeten Zelleten® wurden im Anschluss einer Rückmessung unterzogen. Die Messung zu Beginn und die Rückmessung im Anschluss ermöglichten eine Bestimmung der tatsächlich injizierten Aktivitätsmenge, welche als injected Dose (ID) festgehalten wurde.



Abbildung 15: Beispiel eines μ PET – das in dieser Studie verwendete Inveon Small Animal PET P120 von Siemens.

Nach der Injektion wurden die Tiere zu zweit in einen frischen, ebenfalls auf der Wärmematte befindlichen Käfig mit Nestbaumaterial, Wasser und Futter ad libitum verbracht. Kurz vor Ende der Anreicherungsphase wurde bei den zwei parallel zu messenden Tieren nach demselben Schema wie zuvor die Narkose eingeleitet. Sobald in Narkose, wurden diese auf die mit Heizfolie versehene Liege des μ PET-Scanners (Siemens Inveon P120) transferiert (siehe Abbildung 15). Zum Erhalt der Narkose wurde ein Isofluran Vapor mit

Atemmaske am vorderen Ende der Liege befestigt. Der Erhalt der Narkose erfolgte in Bauchlage bei 1,5 % Isofluran. Die Platzierung der Mäuse erfolgte mit dem Fokus auf dem Herzen im „center field of view“ (FOV) des Scanners. Nach der siebenminütigen Transmissionsmessung erfolgte die 30minütige Emissionsmessung des [^{18}F]-ML10 Tracers. Für die Transmissionsmessung wurde in dieser Studie eine rotierende Cobalt57 Punktquelle genutzt. Unmittelbar im Anschluss wurde der zweite Tracer [^{18}F]-FDG (ca. 20 MBq) über eine der lateralen Schwanzvenen appliziert. Das zu applizierende Volumen wurde standardisiert auf 100 μl mit 0,9 % NaCl-Lösung aufgefüllt und der Venenkatheter im Anschluss mit 50 μl NaCl-Lösung nachgespült. Dieser Vorgang fand, um eine bessere Korrelation der akquirierten Bilder zu erzielen, ohne Bewegung der Mäuse und bei aufrechterhaltener Narkose statt. Nach dreizehn Minuten wurde die Messung der Transmission über sieben Minuten durchgeführt. Die zwanzigminütige Emissionsmessung fand im Anschluss statt. Insgesamt beanspruchten die Messungen einen Zeitraum von 77 Minuten.

Nach Beendigung der Messung wurden die Mäuse weiterhin in Narkose in einer Isofluranüberdosis schmerzlos per zervikaler Dislokation getötet. Die Herzen wurden entnommen und für eine histologische und immunhistochemische Untersuchung prozessiert.

Zur Detektion ionisierender Strahlung wurden stets Körper- und Ringdosimeter von den beteiligten Personen getragen, um die Strahlenexposition des Versuchspersonals entsprechend den Vorgaben des Strahlenschutzes, zu dokumentieren.

2.5.2. Bildrekonstruktion und Auswertung

Die Emissionsdaten wurden mit einem dreidimensionalen iterativen Rekonstruktionsalgorithmus (MAP OSEM - 3D), der vom Hersteller im System implementiert wurde (Inveon Acquisition Workplace; Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA), in einer Matrix von 256 x 256 x 159 Voxeln mit Dimensionen von 0,39 x 0,39 x 0,8 mm^3 rekonstruiert. Hierbei wurden die in der Transmissionsmessung erhaltenen Informationen zur Streu- und Schwächungskorrektur berücksichtigt.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software des Herstellers (Inveon Research Workplace; Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA). Zunächst wurden die Bilder in das Auswertungsprogramm geladen. Um die Bilder der paarweisen gemessenen Tiere separat betrachten zu können, wurden diese jeweils mit dem cutting Tool auseinandergeschnitten und anschließend einzeln gespeichert. Dies wurde bei den Bildern der $[^{18}\text{F}]$ -FDG und bei denen der $[^{18}\text{F}]$ -ML10 Messung durchgeführt. Zur Fusion der Bilder der jeweiligen $[^{18}\text{F}]$ -FDG und der $[^{18}\text{F}]$ -ML10 Messung einer Maus wurden diese nun zusammen geöffnet und manuell in die übereinstimmende Position gebracht. Im Anschluss konnte mit Hilfe des Programmes eine individuelle, dem Infarktareal angepasste, dreidimensionale Volume of Interest (34) manuell festgelegt werden (34). Die korrekte Platzierung der VOI im Infarktareal wurde jeweils in der axialen, koronaren und sagittalen Projektion überprüft (siehe Abbildung 16 - 19).

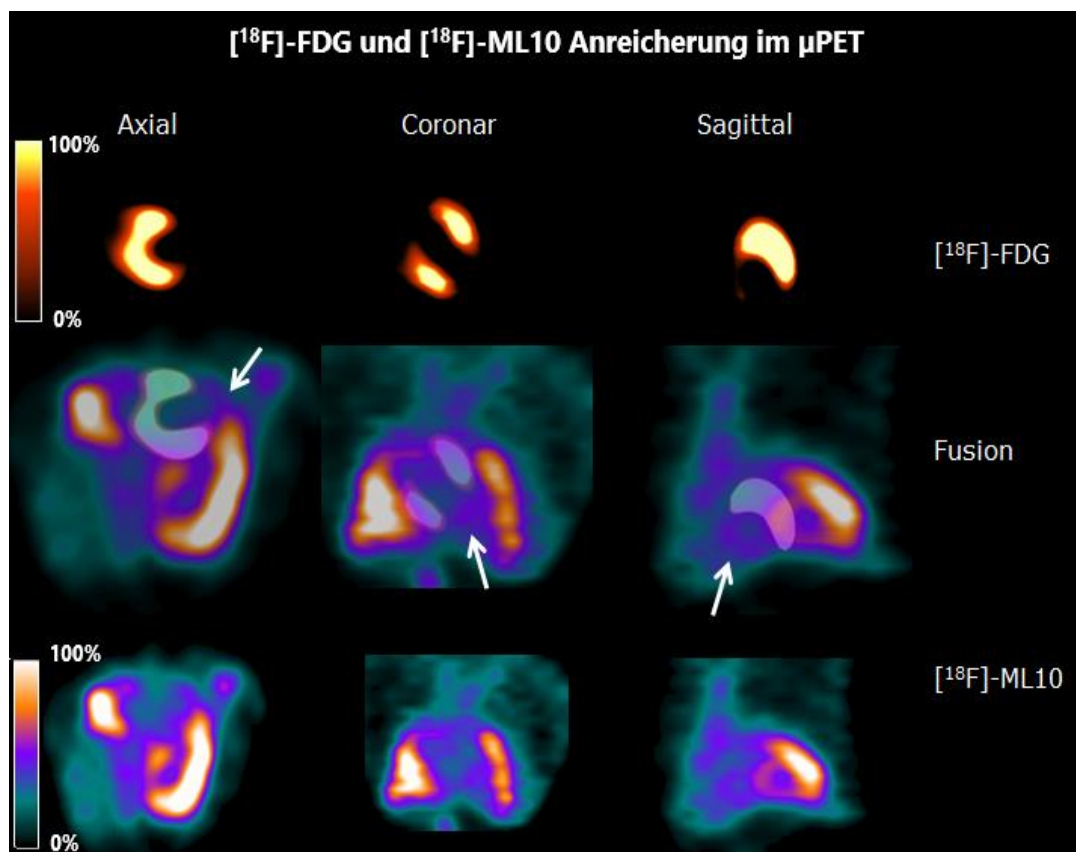


Abbildung 16: Infarktdarstellung in der μ PET Bildgebung, in verschiedenen Achsen mittels $[^{18}\text{F}]$ -FDG (Farbskala: Volcano), $[^{18}\text{F}]$ -ML10 (Farbskala: Ocean) sowie im Fusionsbild; Weißer Pfeil deutet auf das Infarktareal hin (Beispiel aus dieser Studie).

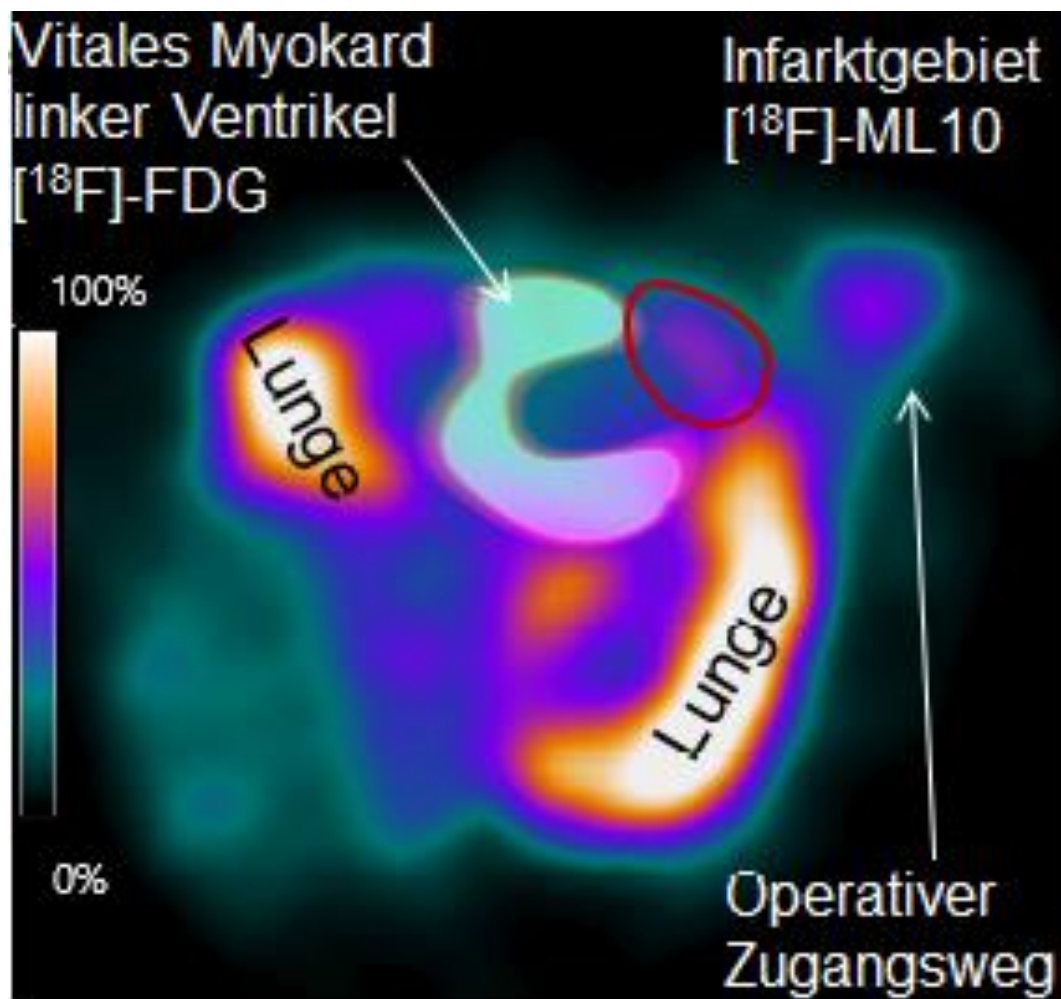


Abbildung 17: Beispielhafte [^{18}F]-ML10 (Farbskala: Ocean) und [^{18}F]-FDG Anreicherung; Darstellung im Fusionsbild Axialansicht (Beispiel aus dieser Studie).

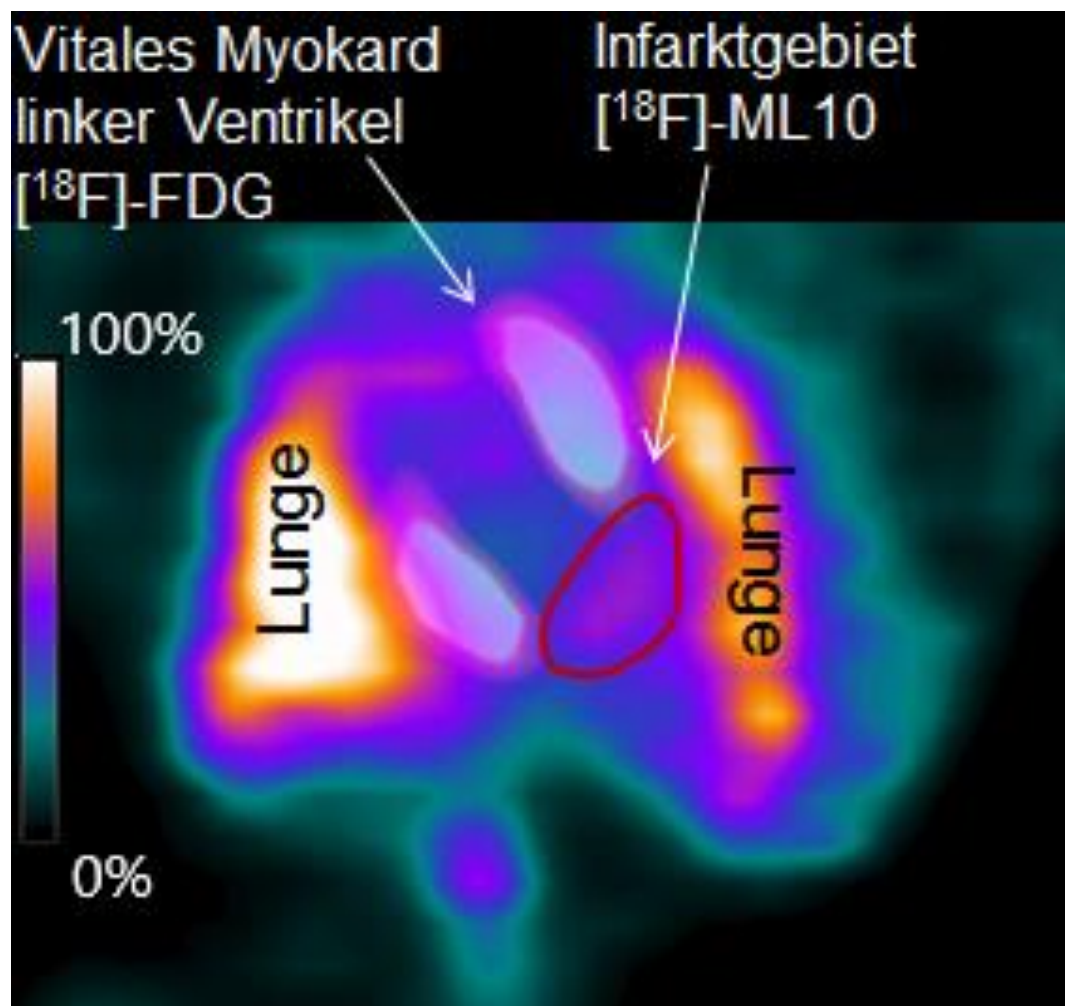


Abbildung 18: Beispielhafte $[^{18}\text{F}]$ -ML10 (Farbskala: Ocean) und $[^{18}\text{F}]$ -FDG Anreicherung; Darstellung im Fusionsbild Coronaransicht (Beispiel aus dieser Studie).

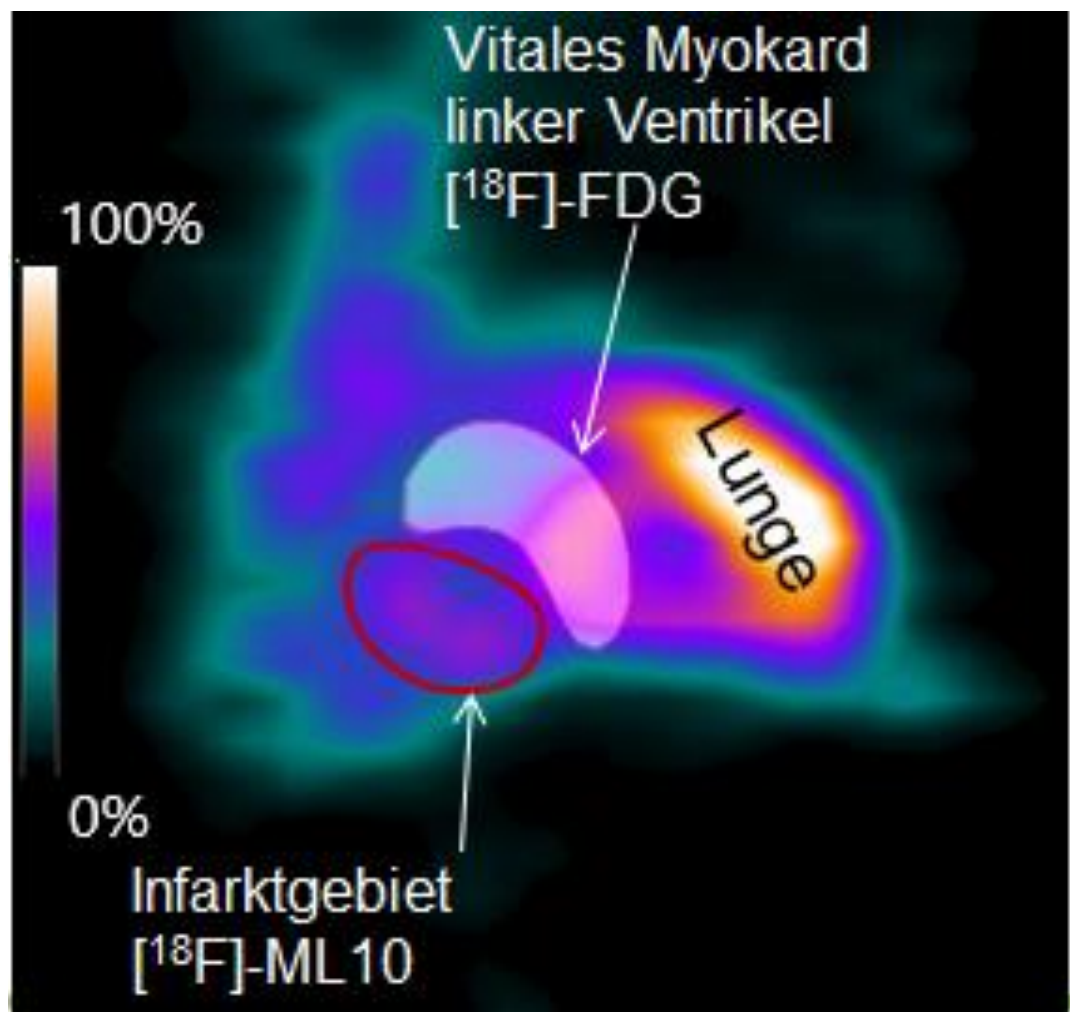


Abbildung 19: Beispielhafte $[^{18}\text{F}]$ -ML10 (Farbskala: Ocean) und $[^{18}\text{F}]$ -FDG Anreicherung; Darstellung im Fusionsbild Sagittalansicht (Beispiel aus dieser Studie).

Zum Vergleich der Anreicherung zwischen den Versuchsgruppen und Modellen, wurde die $(\% \text{ ID/g})_{\max}$, also der Anteil der injizierten Radiopharmakon-Aktivität [^{18}F]-ML10 im Maximalwert je Gramm, im Herzen im Infarktgebiet unter zur Hilfenahme des Volume of Interest bestimmt

$$(\% \text{ ID/g})_{\max} = \frac{\text{VOI}_{\max} \left[\frac{\text{Bq}}{\text{ml}} \right]}{\text{ID} [\text{Bq}]} \times 100$$

VOI_{max} = maximale Anreicherung im Volume of Interest in Becquerel pro Milliliter

ID = “Injected Dose” in Becquerel, injizierte Aktivität

Unter Annahme der Gewebedichte von 1 Gramm/Milliliter ergibt dies $(\% \text{ ID/g})_{\max}$

2.6. Autoradiographie

2.6.1. Durchführung

Die zu untersuchenden Tiere wurden aus dem Heimatkäfig entnommen und in einen auf einer Wärmematte platzierten Käfig gesetzt. Es befand sich Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Zur Injektion des Tracers 135 Minuten vor Herzentnahme wurde jeweils ein operiertes Tier aus dem Käfig entnommen. Das Vorgehen zur Applikation des [^{18}F]-Fluorid markierten Tracers ML10 für die Autoradiographie entspricht dem für die μPET -Messung.

Nach der Injektion wurde das Tier in einen frischen ebenfalls auf der Wärmematte befindlichen Käfig mit Nestbaumaterial, Wasser und Futter ad libitum verbracht. Kurz vor Ende der Anreicherungsphase wurde das Tier nach demselben Schema wie zuvor in die Narkosebox gesetzt und sobald in Narkose befindlich mit einer Überdosis Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Um eine zeitnahe Prozessierung der Herzen und einen geringen Strahlungsverlust durch den Zerfall des Radionuklids gewährleisten zu können, wurden nicht mehr als drei Tiere im zeitlichen Abstand von circa 50 Minuten getötet. Sowohl die Operationen als auch die Injektionen des Tracers waren zeitlich darauf abgestimmt.

2.6.2. Organentnahme

Nach Eintritt des Todes wurden in Rückenlage die Gliedmaßen der Tiere mit Leukoplaststreifen fixiert. Distal des Brustbeins wurde die Bauchhöhle eröffnet. Durch anheben des Brustbeins konnte unter Sichtkontrolle ein Eröffnen des Brustkorbs mit Zugang durch das Zwerchfell, durchgeführt werden. So wurde eine Schädigung der im Brustkorb befindlichen Organe bei der Entnahme vermieden. Weiter wurden beidseits die Rippen bis hin zur vorderen Brustapertur durchtrennt und das Brustbein nach kranial aufgeklappt. Eine freie Sicht auf das Herz und die Lunge war nun gegeben.

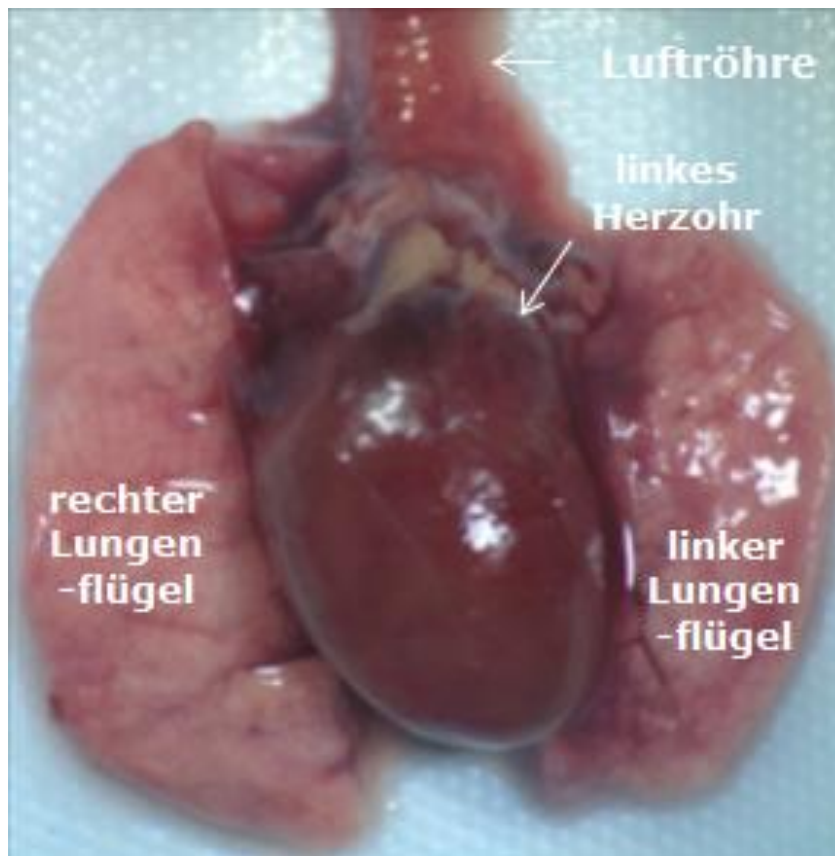


Abbildung 20: Entnommene Organe des Brustkorbs einer Maus (10 Wochen alt) ohne Infarkt (Bild: Jessica Olivier).

Durch Ergreifen der Luftröhre und der Speiseröhre mit einer mikrochirurgischen Pinzette konnte stumpf das Geschlinge entnommen und das Herz von den restlichen Organen befreit werden (siehe Abbildung 20).

Das Herz wurde standardmäßig nach der Entnahme mit einem Milliliter 0,9 % NaCl-Lösung per Zugang über die Gefäßebene mit einer stumpfen Kanüle gespült. Mit der Herzbasis nach unten zeigend wurde das Herz auf einer Zellette® für zehn Sekunden gelagert, um den Blutgehalt in den Herzkammern zu minimieren.

2.6.3. Gefrierschnitte der Autoradiographie

Im Anschluss an die Organentnahme wurden die Herzen unverzüglich in ein Tissue-Tek® Cryomold transferiert, wobei das Herz in seiner Ausrichtung immer gleich positioniert und diese auf dem Cryomold markiert wurde. Das Tissue-Tek®

Cryomold wurde mit Tissue-Tek® Gefriermedium aufgefüllt und zum Gefrieren für circa fünf Minuten in einen Gefrierschrank bei - 80 °C verbracht. Im Anschluss wurde der so entstandene Block mit Hilfe weiteren Tissue-Teks® auf dem Kryostattischchen befestigt. Im Kryostaten wurden 30 µm dicke Scheiben bei circa - 18 °C geschnitten, beginnend an der Herzbasis, circa 1 – 2 mm oberhalb der Ligationstelle des *Ramus interventricularis anterior*. Jeder dritte Schnitt wurde auf einen gereinigten und sialinisierten Objektträger aufgezogen, wobei immer drei Schnitte auf einem Objektträger Platz fanden. Es wurde jeweils bei Auffinden der Ligatur ein Vermerk auf die Objektträger gesetzt, um eine Lageabgrenzung des Infarktgebiets in der Auswertung zu ermöglichen. Sobald das Herz vollständig geschnitten war, wurden die Objektträger in chronologischer Reihenfolge in eine Imaging Kassette mit Imaging Platte verbracht (siehe Abbildung 21). Während der gesamten Prozedur wurde auf eine gleichbleibende Ausrichtung des Herzens geachtet.



Abbildung 21: Imaging Platte und Imaging Kassette (in dieser Studie verwendete Materialien).

Die Imaging Platte wurde über mindestens zwölf Stunden belichtet und im Anschluss im Folienscanner (HD-CR 35 NDT) mittels sensitivem, 12,5 μm -Protokoll des Advanced Image Data Analyzer ausgelesen (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: HD-CR 35 NDT Folienscanner zum Auslesen der belichteten Imaging Platten (in dieser Studie verwendetes Gerät).

2.6.4. Auswertung

Mit Hilfe des Advanced Image Data Analyzer (AIDA) konnten die zuvor erhaltenen Bilder der Autoradiographie ausgewertet werden. Da die Herzen von Basis bis Spitze geschnitten wurden und sich somit nicht jeder Schnitt im Infarktgebiet befand, musste zunächst ein Bereich abgegrenzt werden, der eine Anreicherung des [^{18}F]-ML10 Tracers im möglichen Infarktgebiet darstellt (siehe Abbildung 23).

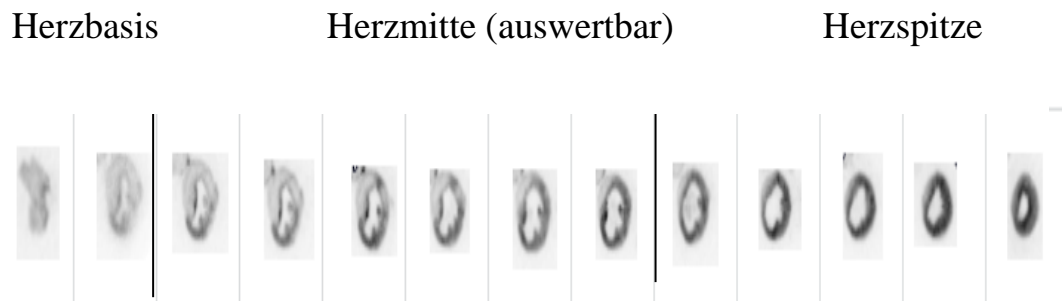


Abbildung 23: Beispielhafte [^{18}F]-ML10 Anreicherung in der Autoradiographie, Grauwerte in jedem Schnitt entsprechend Null bis Maximum (105); Verlauf: Herzbasis- Herzmitte -Herzspitze.

Im Bereich der Herzbasis ist nur unwesentliche bis keine Anreicherung oberhalb des Infarktgebietes sichtbar. Mittig, der zur Auswertung verwendete Bereich mit Anreicherung im Infarktgebiet als Target und mit erkennbar weniger Anreicherung im Nicht-Infarktgebiet (Remotemyokard) als Background. Kontinuierliche zirkuläre Zunahme des angereicherten Areal entsprechend dem erwarteten Versorgungsgebiet des *Ramus interventricularis anterior*. Im apikalen Bereich des linken Ventrikels, findet die Versorgung hauptsächlich durch den *Ramus interventricularis anterior* statt. Somit ist aufgrund eines fehlenden Remotemyokards keine Auswertung möglich.

Durch die konstante Ausrichtung der Herzen auf den Objektträgern und die Markierung des Infarktgebietes konnte eine Anreicherung auf den Bildern eindeutig und reproduzierbar zugeordnet werden. Im Anschluss wurden sechszehn fortlaufende Schnitte aus dem zuvor ermittelten Infarktbereich ausgewählt und jeder zweite Schnitt wie folgt ausgewertet. Zur Bildung des Verhältnisses wurde für jeden ausgewählten Schnitt eine einheitlich definierte Region of Interest (ROI) in Form eines Kreises gewählt. Eine ROI enthielt 384 Pixel und wurde jeweils in das Gebiet der Anreicherung (Target) sowie in den Bereich des Remotemyokards (Background) unter Vermeidung von Randbereichen gelegt. Aus der mittleren Pixel - Intensität jeder Region of Interest, welche der Schwärzung durch das Radionuklid entspricht, konnte so eine prozentuale Mehranreicherung im Infarktgebiet berechnet werden. Das erhaltene Target-to-Background-Verhältnis der ausgewerteten acht Schnitte wurden dann pro Herz gemittelt und im Anschluss den verschiedenen Zeitpunkten zugeordnet.

2.7. Histologische und immunhistochemische Aufarbeitung

2.7.1. Prozessierung der Herzen nach der μ PET Messung

Die Durchführung der histologischen Untersuchungen wurde in Kooperation mit dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Organentnahme und die Prozessierung der Gewebeproben nach der μ PET Messung, erfolgte entsprechend der Organentnahme zur Autoradiographie. Im Anschluss wurde das Herz für 24 h bis 48 h in 4%iger, neutral gepufferter (pH: 7,0), wässriger Formaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde die Formaldehydlösung durch 70 % Ethanol ausgetauscht und die Proben in einen Kühlschrank bei 5 - 8 °C verbracht wo sie längstens 14 Tage aufbewahrt wurden.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Herzen in das Institut für Tierpathologie der Universität München verbracht. Mit Hilfe von Agar wurden die Herzen lagestabil in einem Block ausgegossen. Im Anschluss wurden die Herzen mit einem Lamellator (Eigenkonstruktion, (106)) von der Basis beginnend im Abstand von zwei Millimetern, transversal in drei bis vier äquidistante, planparallele Scheiben geschnitten. Die Herzscheiben wurden jeweils auf die gleiche Seite gelegt, sodass die Herzbasis voran nach unten und letztlich die Herzspitze nach oben zeigte. Unter Beibehaltung dieser Orientierung, wurden die Herzscheiben je einer Maus in eine histologische Kassette, mit einer 1 mm dicken Schaumstoffscheibe zum Schutz vor Verrutschen, verbracht. Bis zur weiteren Verarbeitung am selben Tag im Einbettungsautomaten (Autotechnikon, Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Birkenau), wurden die Kassetten in 70 % Ethanol aufbewahrt. Im Einbettungsautomaten wurden die Proben zunächst 30 Minuten in destilliertem Wasser gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (jeweils zweimal 1,5 Stunden in 70 %, 96 % und 100 % Ethanol). In einem Xylolbad (zweimal 30 Minuten und einmal 1,5 Stunden) wurden die Proben paraffingängig gemacht und abschließend in flüssigem Paraffin bei 60 °C (einmal 2 Stunden und einmal 3 Stunden) bis zur weiteren Verarbeitung durchtränkt. Im Anschluss wurden die Proben an einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding, Medite Medizintechnik, Burgdorf) mit gleichbleibender Ausrichtung in Paraffinblöcke ausgegossen. Dazu wurden

Edelmetall Einbettschälchen (Supra-Mega 60 x 45 x 15 mm, Engelbrecht, Edermünde) verwendet, welche anschließend für ca. 15 Minuten auf eine Kühlplatte bei -10 °C zum Aushärten des Paraffins verbracht wurden.

Mit Hilfe einer Kühlplatte wurden die hergestellten Blöcke gekühlt. Von diesen wurden mit einem Rotationsmikrotom (HM 315, Mikrom, Walldorf) circa 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 37 °C (Daglef Patz, Wankendorf) gestreckt und anschließend auf geschliffene Objektträger (Nr. 11250, 76 x 26 mm Starfrost, Engelbrecht, Edermünde) aufgezogen. Zur Aufbewahrung der Schnitte, wurden diese bei Raumtemperatur in einem Objektträger-Kasten gelagert.

2.7.1.1. Färbung nach Giemsa

Zur allgemeinen Übersichtsdarstellung der Herzen wurde jeweils ein Objektträger mit Paraffinschnitt pro Herz mit Giemsa-Färbung gefärbt. Die Schnitte wurden 10 Minuten in Xylol verbracht und im Anschluss zwei Mal, für 5 Sekunden in 100 % Ethanol getaucht. Weiter wurden die Schnitte für jeweils 5 Sekunden, zwei Mal in 96 % und zwei Mal in 70 % Ethanol getaucht. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in die, in einem Wasserbad bei 65 °C befindliche, Giemsa-Gebrauchslösung getaucht. Nach spülen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten, fand die Differenzierung in 0,5 %iger Essigsäure bis zum Farbumschlag von Rot nach Blau durch circa 3-maliges tauchen statt. Im Anschluss wurden die Schnitte für jeweils 5 Sekunden in 96 % und 100 % Ethanol, sowie für circa 1 Minute in Xylol getaucht. Als Eindeckmedium wurde das nicht-wässrige Eindeckmedium Entellan® verwendet und die Schnitte mit Deckglas eingedeckt.

2.7.1.2. TUNEL-Methode

Auf der Grundlage der festgestellten Diskrepanz der Ergebnisse der Target-to-Background-Auswertung in der Autoradiographie zwischen dem Modell der permanenten und transienten Ischämie wurde zur Darstellung möglicher apoptotischer Zellen im Remotemyokard (nicht vom Infarkt betroffenes Myokard; Background), die Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated

biotinylated dUTP nick end-labeling (TUNEL)-Methode gewählt (107). Eine Auswertung der TUNEL-Färbung im Infarktgebiet wurde nicht durchgeführt, da dieses nicht eindeutig identifizierbar war. Die TUNEL-Färbung wurde nach dem empfohlenen Protokoll der Firma Millipore mit dem entsprechenden KIT (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7100) durchgeführt. Zur Entparaffinierung der Schnitte wurden diese dreimal für 5 Minuten in Xylol, zweimal für 5 Minuten in 100 % Ethanol, jeweils einmal für 5 Minuten in 95 % und 70 % Ethanol sowie für weitere 5 Minuten in PBS getaucht. Im Anschluss wurde zur Vorbehandlung auf jeden Schnitt Proteinkinase K in PBS (20 µg/ml) für 15 Minuten gegeben. Folgend wurden die Schnitte zweimal für 2 Minuten in destilliertes Wasser getaucht. Zum Blockieren wurden diese für 5 Minuten lang in 3 % H₂O₂ verdünnt in PBS gegeben. Folgend wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in Wasser getaucht. Anschließend wurde für die Pufferung der im KIT enthaltene Equilibration Buffer auf die Schnitte gegeben und circa 10 Minuten später die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgeklopft. Zur Enzymreaktion wurde das im KIT enthaltene working strength TdT, in einem Verhältnis von 1 : 3 (Enzym : Reaktionspuffer) auf die Schnitte gegeben und diese für 1 Stunde bei 37 °C im feuchten Brutschrank belassen. Im Anschluss daran wurde der im KIT enthaltene Waschpuffer auf die Schnitte gegeben, diese wurden für 15 Sekunden geschwenkt und für 10 Minuten so belassen. Dreimal wurden die Schnitte für je 1 Minute in PBS gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit wieder abgeklopft. Weiter wurde das im KIT enthaltene, auf Raumtemperatur erwärmte Anti-Digoxigenin conjugate auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Nach dieser Zeit wurden die Schnitte viermal für 2 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurde für circa 5 Minuten das im KIT enthaltene Peroxidase Substrat (0,05% DAB) in Färbepuffer (PBS) auf die Schnitte gegeben. Für die optimale Färbezeit mussten die Proben wiederholt unter dem Mikroskop auf eine braune Anfärbung hin überprüft werden. Im Anschluss wurden die Schnitte sofort dreimal für 1 Minute und einmal für 5 Minuten in destilliertes Wasser getaucht. Zum Dehydrieren wurden die Schnitte dreimal für 2 Minuten in Xylol getaucht. Im Anschluss an die Verarbeitung wurden die Schnitte mit dem nicht-wässrigen Eindeckmedium, Entellan® und Deckgläschen konserviert. Während der gesamten Färbung wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten.

2.7.1.2.1. Auswertung

Um das Ausmaß der apoptotischen Zellen im Bereich des Remotemyokards (nicht vom Infarkt betroffenes Myokard) zu erfassen, wurden in Apoptose befindliche Zellen, mit Hilfe der TUNEL-Methode detektiert. Für jedes Tier wurden Paraffinschnitte angefertigt und diese mit der TUNEL-Methode, wie beschrieben, gefärbt. Die Schnitte wurden mit Hilfe des Durchlichtmikroskops Primo Star und gekoppelter Axio cam 105 color in einer 40-fachen Vergrößerung sowie mit dem Programm Axio Version SE64 (Version 4.9) ausgewertet.

Die myokardialen Infarktgebiete in den histologischen Präparaten ließen sich aufgrund der kurzen Zeitintervalle zwischen experimenteller Induktion der Infarkte und der Organentnahme in der gewählten Färbung nicht zweifelsfrei morphologisch von unveränderten Myokardarealen differenzieren. Deshalb wurden innerhalb der histologischen Schnitte solche Schnittareale definiert, die entsprechend der experimentellen Vorgehensweise kein Infarktgebiet enthielten (Remotemyokard: An das Septum (*Septum interventriculare cordis*) angrenzender Anteil des linken Ventrikels (*Ventriculus cordis sinister*). Es wurde in jeweils drei Gesichtsfeldern (nicht systematisch) pro Tier, die Anzahl TUNEL-positiver Zellkernanschnitte und TUNEL-negative Zellkernanschnitte ausgewertet. Daraus konnte der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte an sämtlichen ausgezählten Zellkernen in den Gesichtsfeldern im Remotemyokard ermittelt werden (pro Tier wurden durchschnittlich 226 ± 54 Zellkernanschnitte ausgezählt).

2.7.2. Prozessierung der Herzen nach der Autoradiographie Messung

Mittels Autoradiographie gemessene Schnitte wurden am Folgetag Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Es wurde das empfohlene HE Färbeprotokoll der Firma Merck verwendet. Zellkerne stellen sich in dieser Färbung blau, Zytoplasma, Bindegewebe, Kollagenfasern und Erythrozyten rot dar. Apoptotische Zellen sind nicht differenzierbar in dieser Färbung. Die Schnitte wurden lediglich für eine visuelle Übereinstimmung der anatomischen Strukturen mit dem angereicherten Infarktgebiet der Autoradiographieaufnahmen herangezogen.

2.8. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die erhobenen Daten mittels SPSS ausgewertet. Um die zeitliche Abfolge innerhalb der Gruppen auswerten zu können, wurde zunächst jeweils ein Test auf Homogenität der Varianzen basierend auf dem Mittelwert durchgeführt. Bei vorliegender Varianzhomogenität wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA zwischen den verschiedenen Zeitpunkten mit einem Tukey's- Honestly Significant Difference (HSD) post-hoc Test durchgeführt. Bei signifikantem Unterschied der Varianzen wurde der Welch-Test als robustes Testverfahren zur Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte durchgeführt und ein Games-Howell post hoc Test zum Mehrfachvergleich zwischen den Gruppen angewendet. Zur Auswertung der Effektstärke wurde der Cohens d Test gewählt und die relative Differenz der Mittelwerte in Prozent betrachtet. Ein großer Effekt ist definiert mit $|d| \geq 0,8$, ein mittlerer Effekt mit $|d| \geq 0,5$ sowie ein kleiner Effekt mit $|d| \geq 0,2$. Ebenso wurde für das Maß der individuellen Streuung innerhalb der Gruppe der Variationskoeffizient berechnet. Als Fehlerindikator wurde der Standard error mean (SEM) berechnet. Zum Vergleich der Ergebnisse zu den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Modells sowie zwischen den Modellen der permanenten und der transienten Ischämie wurde der Student's t-Test verwendet.

Im Tierversuchsantrag wurde die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art mit 0,2 angegeben, sodass sich eine Power von 80 % bei der verwendeten Fallzahl ergibt.

V. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Autoradiographie

1.1. Modell der permanenten Ischämie im zeitlichen Verlauf

Abbildung 24 zeigt repräsentative Autoradiographieschnitte mit $[^{18}\text{F}]$ -ML10 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt im Modell der permanenten Ischämie.
















Permanente Ischämie			
Zeitpunkt	Herzspitze	Herzmitte	Herzbasis
2h			
4h			
6h			
24h			
48h			

Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 im Modell der permanenten Ischämie in der Autoradiographie. Schwärzung ist proportional zu der Anreicherung der Radioaktivität.

Bei der Auswertung der Autoradiographie im Modell der permanenten Ischämie wurde, auf Grund des Ausfalls eines Versuchstieres, zur statistischen Auswertung der Zeitpunkt 2 Stunden mit dem Zeitpunkt 4 Stunden zusammengefasst. Es zeigte sich ein Maximum des Target-to-Background – Verhältnisses zum Zeitpunkt 2 - 4 Stunden gemittelt über $n = 5$ Tiere mit einer 3,13 -fachen mittleren Mehranreicherung. Der Zeitpunkt mit einem Minimum von 1,27 -facher mittlerer Mehranreicherung des Infarktgebietes zum Remotemyokard gemittelt über $n = 3$ Tiere fand sich zum Zeitpunkt 48 Stunden. Der größte Effekt zeigte sich vom Zeitpunkt 6 Stunden zu 24 Stunden mit einem Cohens d Wert von 9,76. Ebenfalls große Effekte zeigten sich im Vergleich 2 - 4 Stunden mit 6 Stunden mit einem Cohens d Wert von 2,42 und von 24 Stunden zu 48 Stunden mit einem Cohens d Wert von 4,11. Der Variationskoeffizient war mit 13 % zum Zeitpunkt 2 - 4 Stunden am höchsten.

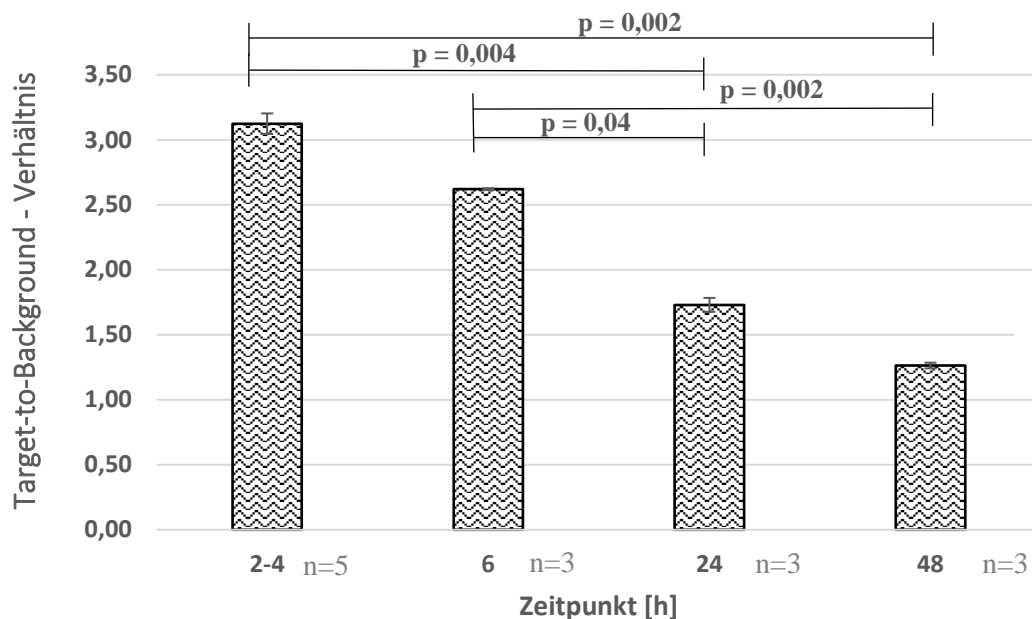


Abbildung 25: Anreicherung von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 im Target-to-Background Verhältnis; Vergleich des Target-to-Background - Verhältnisses zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der permanenten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.

Es zeigte sich im Vergleich des Target-to-Background – Verhältnisses zwischen den Zeitpunkten mittels Welch-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$) in der prozentualen Mehranreicherung im Infarktgebiet im Verhältnis zum Remotemyokard. Im Mehrfachvergleich mittels Games-Howell post-hoc Test zeigte sich im Vergleich zwischen dem Zeitpunkt 2 - 4 Stunden zu 24 Stunden ($p = 0,004$) und 2 - 4 Stunden zu 48 Stunden ($p = 0,002$) eine signifikant höhere Mehranreicherung. Ebenfalls zeigte sich im Vergleich des Target-to-Background – Verhältnisses zwischen dem Zeitpunkt 6 Stunden zu dem Zeitpunkt 24 Stunden ($p = 0,04$) und von 6 Stunden zu dem Zeitpunkt 48 Stunden ($p = 0,002$) eine signifikant höhere Mehranreicherung (siehe Abbildung 25).

1.2. Modell der transienten Ischämie im zeitlichen Verlauf

Abbildung 26 zeigt repräsentative Autoradiographieschnitte mit [^{18}F]-ML10 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt im Modell der transienten Ischämie.










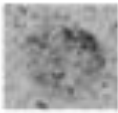
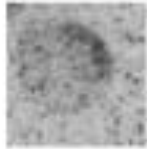




<div> <div>Transiente Ischämie</div> </div>			
Zeitpunkt	Herzspitze	Herzmitte	Herzbasis
2h			
4h			
6h			
24h			
48h			

Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im Modell der transienten Ischämie in der Autoradiographie. Schwärzung ist proportional zur der Anreicherung der Radioaktivität.

In der Auswertung der Autoradiographie des Modells der transienten Ischämie, wurden zur Vergleichbarkeit mit dem Modell der permanenten Ischämie die Zeitpunkte 2 Stunden und 4 Stunden ebenfalls zusammengefasst. Zur Vergleichbarkeit mit der Methode der μ PET-Messung wurde auch eine Einzelauswertung des Target-to-Background-Verhältnisses zu den Zeitpunkten vorgenommen. Es zeigte sich hierbei ein Maximum des Target-to-Background-Verhältnisses zum Zeitpunkt 6 Stunden gemittelt über $n=3$ Tiere mit einer 2,39-fachen mittleren Mehranreicherung in der Auswertung der zusammengefassten Zeitpunkte und ein Maximum bei 2 Stunden gemittelt über $n=3$ Tiere mit einer 2,47-fachen mittleren Mehranreicherung in der Einzelauswertung. Der Zeitpunkt mit dem Minimum des Target-to-Background-Verhältnisses gemittelt über $n=3$ Tiere von einer 1,29-fachen mittleren Mehranreicherung des Infarktgebietes zum Remotemyokard fand sich zum Zeitpunkt 48 Stunden. Der größte Effekt zeigte sich im Target-to-Background-Verhältnis vom Zeitpunkt 24 Stunden zu 48 Stunden mit einem Cohens d Wert von 3,71, ebenfalls konnte ein mittlerer Effekt im Vergleich 2 mit 4 Stunden mit einem Cohens d Wert von 0,72 festgestellt werden. Der Variationskoeffizient stieg vom Zeitpunkt 2 - 4 Stunden von zunächst 19 % an und erreichte zum Zeitpunkt 6 Stunden mit 35 % sein Maximum und fiel dann kontinuierlich ab.

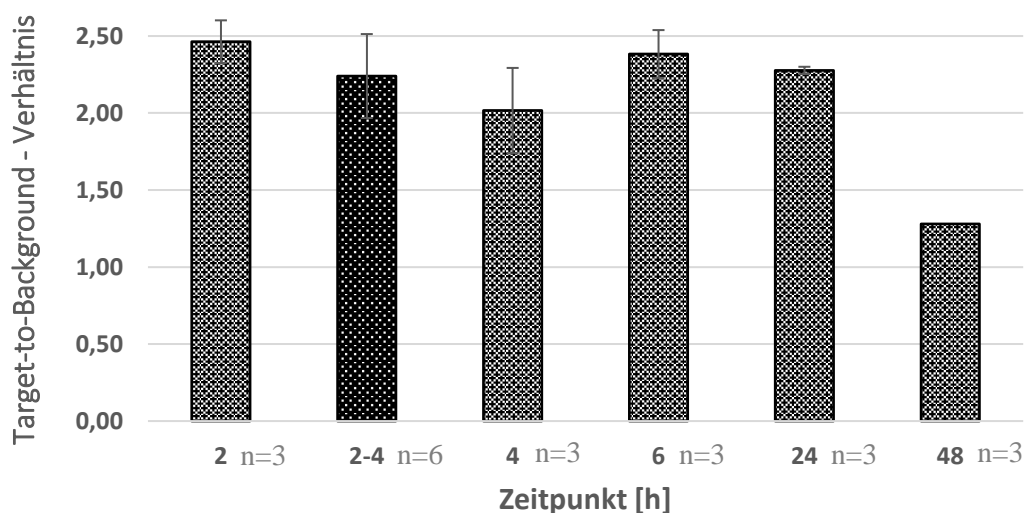


Abbildung 27: Anreicherung von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 im Target-to-Background-Verhältnis; Vergleich des Target-to-Background – Verhältnisses zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der transienten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.

Im Vergleich der Zeitpunkte im Verlauf mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) konnte weder zu den Einzelzeitpunkten, noch zu den zusammengefassten Zeitpunkten ein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied festgestellt werden. Ebenso ergab sich in der post-hoc Analyse mittels Tukey's-HSD Test kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 27).

1.3. Vergleich der Modelle in der Autoradiographie

Mittels Student's t-Test zeigte sich im Vergleich der Modelle zum Zeitpunkt 2 - 4 Stunden, eine signifikant höhere Mehranreicherung ($p = 0,046$) des Infarktgebietes im Verhältnis zum Remotemyokard im Modell der permanenten Ischämie. Im Vergleich der übrigen Zeitpunkte zwischen den Modellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der [^{18}F]-ML10 Anreicherung (siehe Abbildung 28).

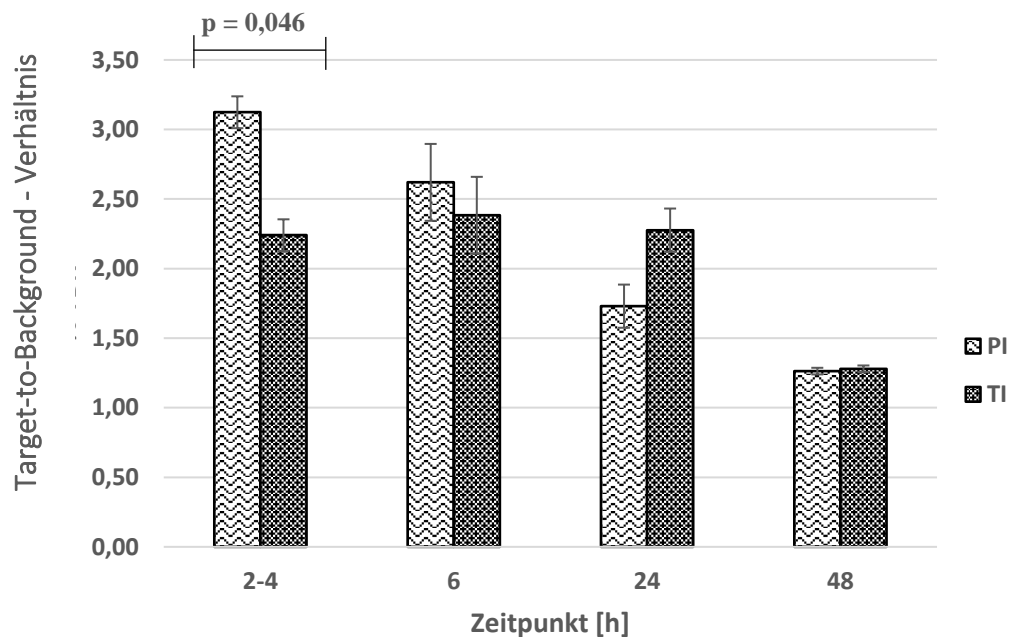


Abbildung 28: Anreicherung in der Autoradiographie von [^{18}F]-ML10 im Target-to-Background Verhältnis; Vergleich des Target-to-Background - Verhältnisses zu den Zeitpunkten zwischen dem Modell der transienten (TI) und permanenten Ischämie (PI); Fehlerindikator: standard error mean.

2. Ergebnisse der μ PET-Messung

Abbildung 29 zeigt eine repräsentative Anreicherung in einer Maus von [^{18}F]-FDG mit Fokus auf dem Herzen nach Okklusion des *Ramus interventricularis anterior*.

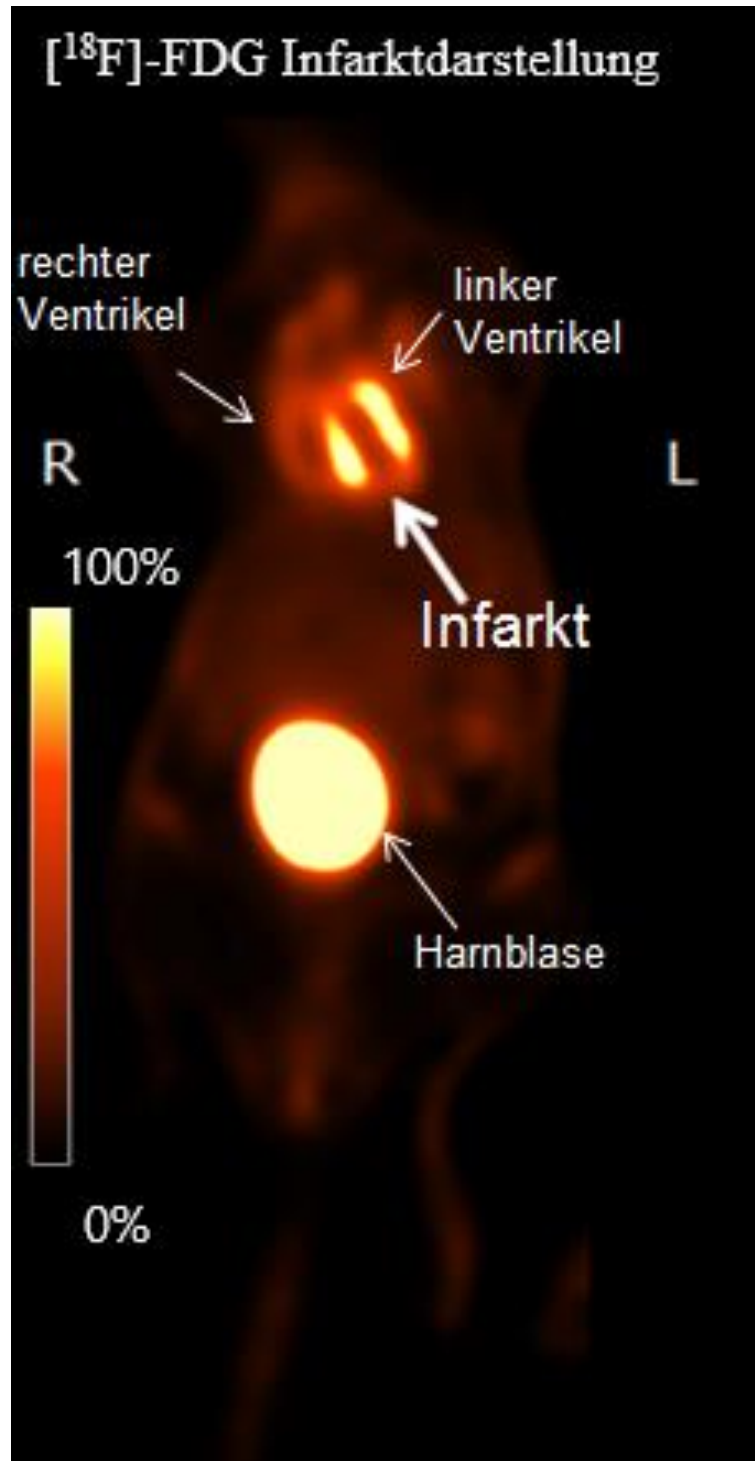


Abbildung 29: Infarktdarstellung in der μ PET-Bildgebung mittels [^{18}F]-FDG (Farbskala: Volcano) in coronarer Ansicht. Weißer Pfeil deutet auf das Infarktareal hin (Beispiel aus dieser Studie).

2.1. Modell der permanenten Ischämie im zeitlichen Verlauf

In der Auswertung der μ PET Messung im Modell der permanenten Ischämie zeigte sich ein Maximum zum Zeitpunkt 2 Stunden mit $0,33 (\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ Anreicherung gemittelt über $n = 6$ Tiere. Ein Minimum von $0,04 (\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ Anreicherung gemittelt über $n = 5$ Tiere des Infarktgebietes fand sich zum Zeitpunkt 48 Stunden. Der größte Effekt zeigte sich im Vergleich der Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden mit einem Cohens d Wert von 2,14. Ebenfalls große Effekte zeigten sich im Vergleich 2 Stunden mit 4 Stunden mit einem Cohens d Wert von 0,96 und von 6 Stunden zu 24 Stunden mit einem Cohens d Wert von 0,83. Der Variationskoeffizient war mit 68 % zum Zeitpunkt 2 Stunden am höchsten und nahm kontinuierlich ab. Der größte relative Unterschied fand sich im Variationskoeffizienten zum Zeitpunkt zwischen 4 Stunden und 6 Stunden mit einer Abnahme von 14 %.

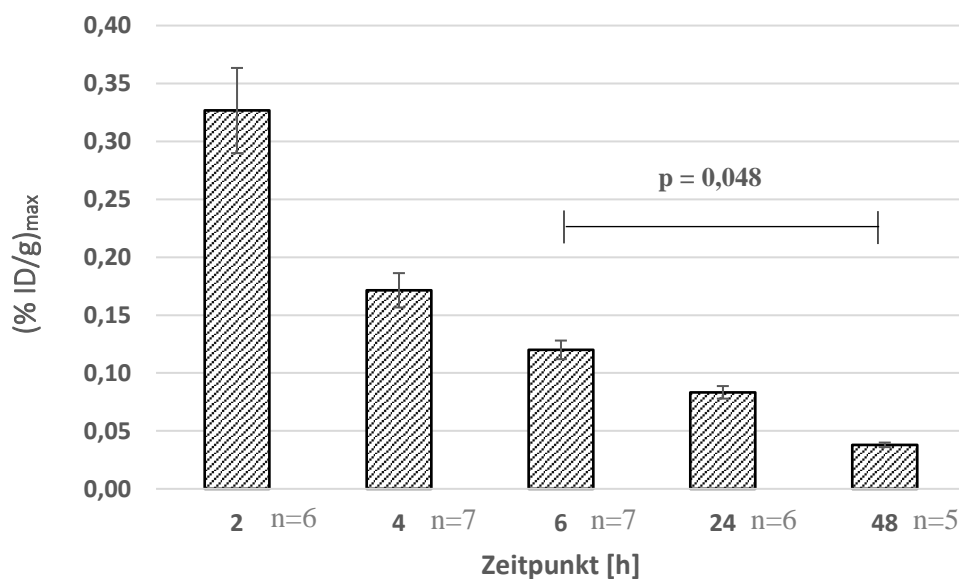


Abbildung 30: Anreicherung in der μ PET-Methode von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 in $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$; Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der permanenten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.

Es zeigte sich im Vergleich aller Zeitpunkte mittels Welch-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) in der maximalen Infarktanreicherung im Verhältnis zur injizierten Aktivität. Im Mehrfachvergleich mittels Games-Howell post-hoc Test zeigte sich im Vergleich zwischen dem Zeitpunkt 6 Stunden zu 48 Stunden ($p = 0,048$) eine signifikant höhere Anreicherung (siehe Abbildung 30).

2.2. Modell der transienten Ischämie im zeitlichen Verlauf

In der Auswertung der μ PET-Messung im Modell der transienten Ischämie zeigte sich ein Maximum zum Zeitpunkt 2 Stunden mit $0,86 (\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ Anreicherung gemittelt über $n = 7$ Tiere. Der Zeitpunkt 48 Stunden bildete das Minimum von $0,07 (\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ Anreicherung des Infarktgebietes gemittelt über $n = 4$ Tiere. Der größte Effekt zeigte sich vom Zeitpunkt 2 Stunden zu 4 Stunden mit einem Cohens d Wert von 1,25. Ebenfalls ein großer Effekt zeigte sich im Vergleich 6 Stunden zu 24 Stunden mit einem Cohens d Wert von 0,91. Der Variationskoeffizient war mit 154 % zum Zeitpunkt 6 Stunden am höchsten und nahm zu den späteren Zeitpunkten kontinuierlich ab. Der größte relative Unterschied fand sich im Variationskoeffizienten der Zeitpunkte 4 Stunden und 6 Stunden mit einer Zunahme von 113 %. Sichtbar war eine relative Abnahme der Anreicherung im Verhältnis zur injizierten Dosis vom Zeitpunkt 2 Stunden zu 4 Stunden um 67 % und zu 6 Stunden um 48 %.

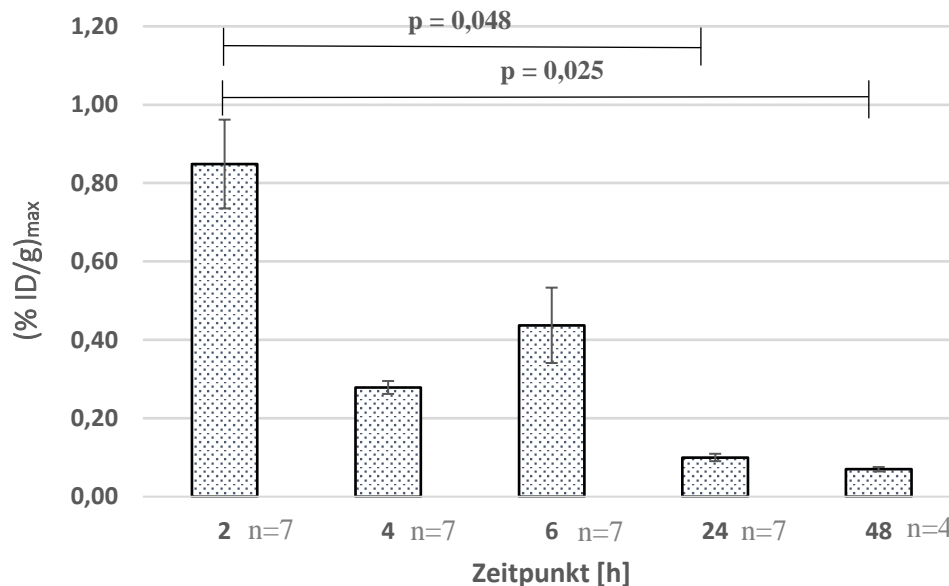


Abbildung 31: Anreicherung in der μ PET Methode von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 in $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$; Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der transiente Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.

Es zeigte sich im Vergleich der Zeitpunkte mittels Welch-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,003$) in der maximalen Infarktanreicherung im Verhältnis zur injizierten Dosis. Im Mehrfachvergleich mittels Games-Howell post-hoc Test zeigte sich im Vergleich zwischen dem Zeitpunkt 2 Stunden zu 24 Stunden ($p = 0,048$) sowie im Vergleich zwischen 2 Stunden und 48 Stunden ($p = 0,025$) eine signifikant höhere Mehranreicherung (siehe Abbildung 31).

2.3. Vergleich der Modelle in der μ PET Messung

Im Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ des permanenten zum transienten Ischämie-Modell mittels Student's t-Test, zeigte sich zu den zusammengefassten frühen Zeitpunkten 2 – 6 Stunden ($p = 0,043$) und zum Zeitpunkt 48 Stunden ($p = 0,039$) eine signifikant höhere Anreicherung im transienten Ischämie-Modell (siehe Abbildung 32).

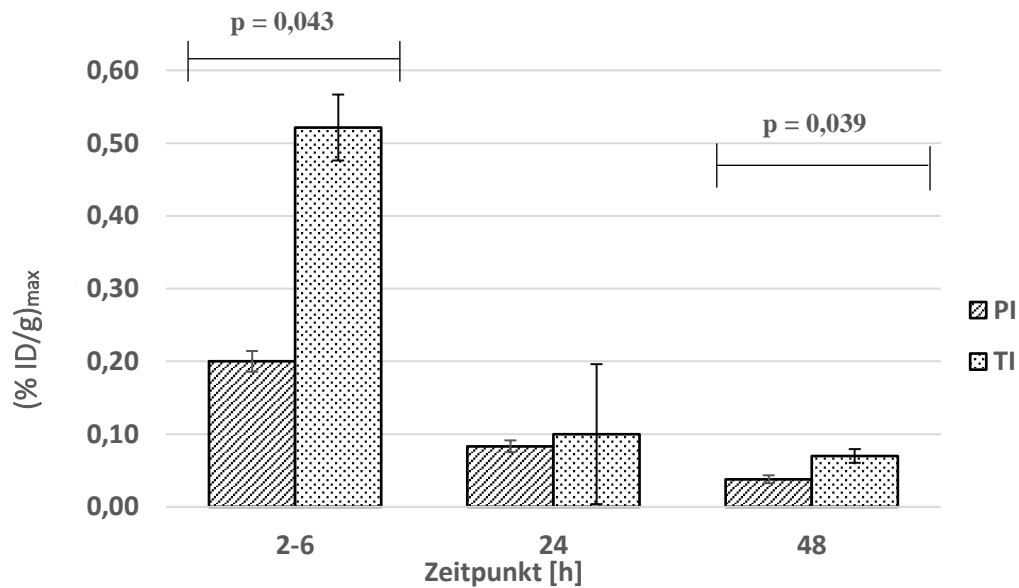


Abbildung 32: Anreicherung in der μ PET Methode von $[^{18}\text{F}]$ -ML10 in $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$; Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ zu den Zeitpunkten zwischen dem Modell der transienten (TI) und permanenten Ischämie (PI); Fehlerindikator: standard error mean.

3. Ergebnisse der Histologie

3.1. TUNEL-positive Zellen in der Gesichtsfeldauswertung

Zur differenzierten Betrachtung einzelner Bereiche des Herzens nach Myokardinfarkt wurden Gesichtsfelder im Bereich des Remotemyokards auf TUNEL-positive Zellenkernanschnitte im Verhältnis zur Anzahl aller Zellenkernanschnitte hin untersucht. Abbildung 33 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt eines Herzens im Modell der permanenten Ischämie.

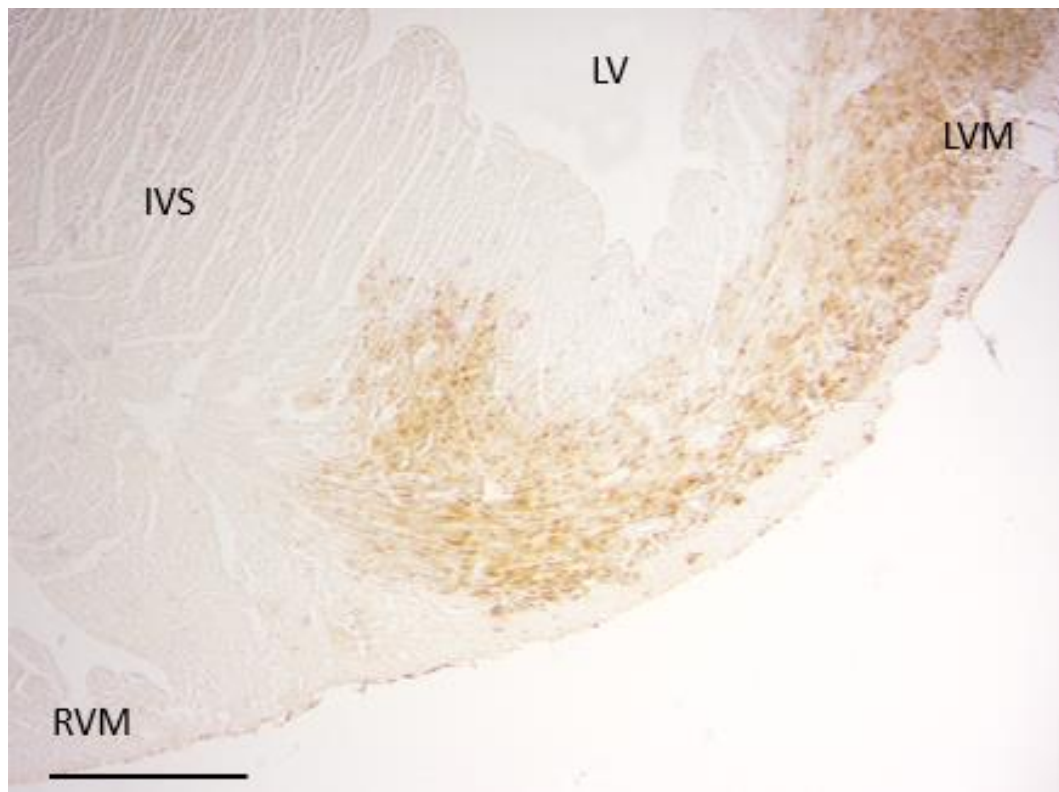


Abbildung 33: Darstellung von in Apoptose befindlicher (TUNEL-positiver) Kardiomyozyten im Ventrikelmyokard einer Maus im Modell der permanenten Ischämie.

Transversaler Schnitt durch den Rand des Infarktgebietes in Höhe der rechten und linken Herzkammer. LVM: Linkes Ventrikelmyokard. RVM: Rechtes Ventrikelmyokard. IVS: Interventrikuläres Septum. LV: Linker Ventrikel. Im Infarktgebiet des LVM befinden sich zahlreiche Anschnitte TUNEL-positiver Kardiomyozyten. FFPE. TUNEL-Färbung. Maßstab = 500 µm. Die Aufnahme wurde zur Verbesserung der Bildqualität digital nachbearbeitet (Entfernung von Verunreinigungsartefakten).

3.1.1. Modell der permanenten Ischämie im zeitlichen Verlauf

In der Auswertung der Gesichtsfelder des Remotemyokards im Modell der permanenten Ischämie zeigte sich ein Maximum gemittelt über $n = 6$ Tiere zum Zeitpunkt 24 Stunden mit einem mittleren Anteil von 6 % TUNEL-positiver Zellen. Ein Minimum von 1 % gemittelt über $n = 5$ Tiere fand sich zum Zeitpunkt 48 Stunden. Der größte Effekt zeigte sich im Vergleich der Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden mit einem Cohens d Wert von 1,56. Ein ebenfalls großer Effekt zeigte sich im Vergleich von 6 Stunden zu 24 Stunden mit einem Cohens d Wert von 0,95.

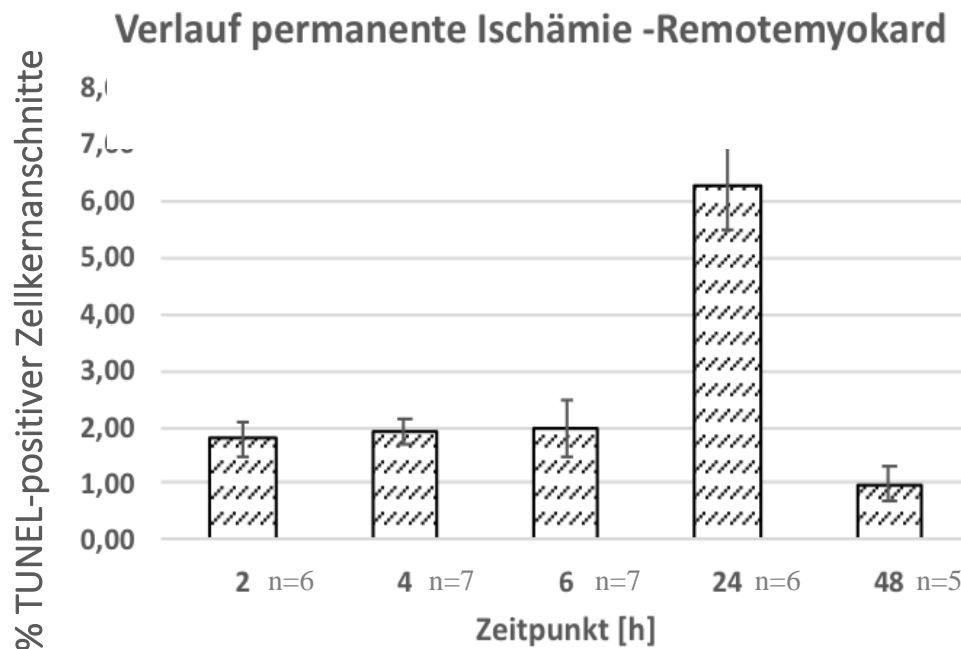


Abbildung 34: Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard; Vergleich des prozentualen Anteils TUNEL-positiver Zellkernanschnitte zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der permanenten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.

Es zeigte sich im Vergleich des prozentualen Anteils TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard zwischen den Zeitpunkten mittels Welch-Test kein statistisch signifikanter Unterschied. Im Mehrfachvergleich mittels Games-Howell post-hoc Test wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied gefunden (siehe Abbildung 34).

3.1.2. Modell der transienten Ischämie im zeitlichen Verlauf

In der Auswertung der Gesichtsfelder des Remotemyokards im Modell der transienten Ischämie zeigte sich ein Maximum des prozentualen Anteiles der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte gemittelt über $n = 7$ Tiere zum Zeitpunkt 2 Stunden. Es zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme bis zu einem Minimum gemittelt über $n = 4$ Tiere zum Zeitpunkt 48 Stunden. Der größte Effekt zeigte sich im Vergleich der Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden mit einem Cohens d Wert von 0,8. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte im Vergleich der Zeitpunkte (siehe Abbildung 35).

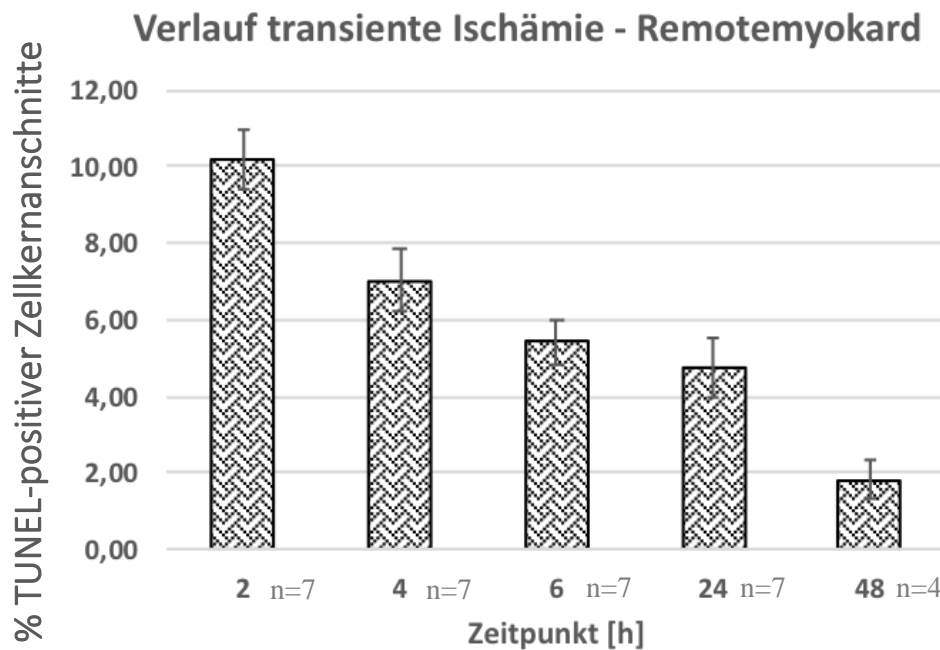


Abbildung 35: Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard; Vergleich des prozentualen Anteils TUNEL-positiver Zellkernanschnitte zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der transienten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.

3.1.3. Vergleich der Modelle

Der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard war im Modell der transienten Ischämie zum Zeitpunkt 2 Stunden signifikant erhöht ($p \leq 0,01$) gegenüber dem Modell der permanenten Ischämie. Ebenfalls fand sich zum Zeitpunkt 4 Stunden ein signifikant höherer, prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im transienten Ischämie-Modell ($p = 0,05$). Insgesamt ließ sich im Modell der transienten Ischämie zu den frühen Zeitpunkten 2 – 6 Stunden ein signifikant erhöhter Anteil TUNEL-positiver Zellen ($p \leq 0,01$) gegenüber dem Modell der permanenten Ischämie feststellen. Zu den einzelnen übrigen Zeitpunkten (6 h, 24 h, 48 h) fand sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich des prozentualen Anteils der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte zwischen den Modellen (siehe Abbildung 36).

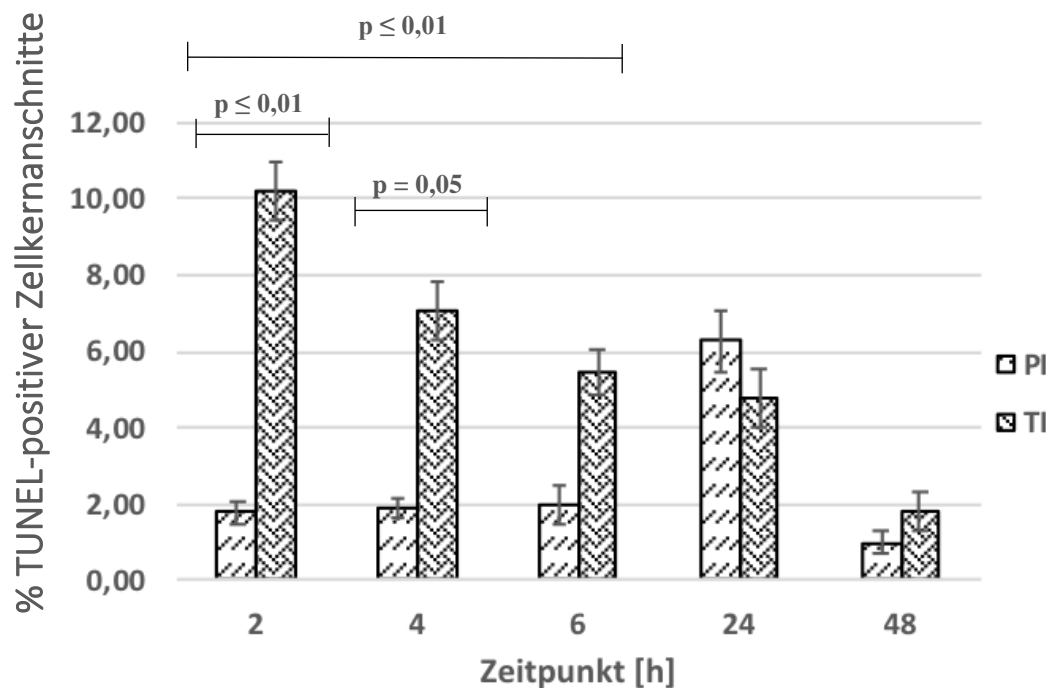


Abbildung 36: Vergleich des prozentualen Anteils der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte im Remotemyokard zu den Zeitpunkten zwischen dem Modell der transienten (TI) und permanenten Ischämie (PI); Fehlerindikator: standard error mean.

VI. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Apoptose im Infarktmodell der Maus mittels molekularer Bildgebung mit dem PET Tracer [^{18}F]-ML10 darzustellen. Der Schwerpunkt der Arbeit bezog sich auf die μPET -Messung und wurde unterstützt durch die Befunde der Autoradiographie. Dabei lag der Fokus auf der Darstellung der kardialen [^{18}F]-ML10 Anreicherung im zeitlichen Verlauf in den Modellen der permanenten und transienten Ischämie des Herzens. Es wurde der Zeitpunkt mit möglichst hoher Apoptoserate und gleichzeitig geringem Variationskoeffizienten bestimmt. Dadurch sollte ein geeigneter Zeitpunkt als Referenz für die Messung der Apoptose nach Interventionstherapie bestimmt werden.

1. Darstellung der kardialen Apoptose im Ischämie-Modell

Die Eignung von ML10 zur Darstellung der Apoptose konnte in früheren Studien nachgewiesen werden. Cohen et al. konnten zeigen, dass sowohl Tritium markiertes als auch Dansyl gekoppeltes ML10 in apoptotischen Zellen, jedoch nicht in nekrotischen oder vitalen Zellen, anreicherte. Die Anreicherung in den apoptotischen Zellen erreichte dabei fast das 10-fache verglichen zu Kontrollzellen oder nekrotischen Zellen (76). Auch Hyafil et al. konnten in einer präklinischen Studie nachweisen, dass ML10 in atherosklerotischen Plaques vermehrt anreichert und die erhöhte Apoptose in diesen detektieren kann (82). Reshef et al. konnten bereits 2008 mittels in vivo [^{18}F]-ML10 μPET -Messungen im Schlaganfall-Modell in CD Ratten und BALB/c Mäusen eine Anreicherung im betroffenen, ipsilateralen Gebiet und eine erhöhte Clearance aus dem kontralateralen, nicht ischämischen Gebiet aufzeigen (81).

In dieser Studie zeigte sich sowohl in der μPET (Abb. 16-19) als auch in der Autoradiographie (Abb. 23, 24, 26) eine signifikant erhöhte [^{18}F]-ML10 Anreicherung im Versorgungsgebiet des *Ramus interventricularis anterior* nach permanenter oder transientscher Ischämie. Somit erscheint [^{18}F]-ML10 geeignet, die kardiale Apoptose als wahrscheinlichstes, funktionelles Korrelat der erhöhten Traceranreicherung im postischämischen Herzen darzustellen. Dies wird durch eine erst kürzlich von Ma et al. publizierte Studie bestätigt, in welcher [^{18}F]-ML10 zur Visualisierung und Quantifizierung der Apoptose im kardialen Ischämie-Modell in Ratten verwendet wurde (108).

2. Zeitlicher Verlauf der [^{18}F]-ML10 Anreicherung

2.1. Modell der permanenten Ischämie

In der Autoradiographie zeigte sich nach permanenter Okklusion des *Ramus interventricularis anterior* das höchste Target-to-Background Verhältnis und somit vermutlich das höchste Maß an Apoptose bereits zum ersten Messzeitpunkt 2 – 4 Stunden nach Myokardinfarkt. Auch in der in vivo μPET -Messung bestätigte sich das Ergebnis der Autoradiographie mit einer maximalen Traceranreicherung bereits nach 2 Stunden. Veinot et al. schlussfolgerten nach der Auswertung von humanen Herzgewebeproben nach Myokardinfarkt, dass die Apoptose bereits sehr früh (2 bis 3 Stunden) nach Infarkt stattfindet und initial den mit Abstand größten Faktor für Zelltod darstellt (109). Die gute Korrelation dieser histopathologischen Studie mit den in unserer Studie gewonnenen Ergebnissen unterstreicht die Validität unserer Methode. Ferner lässt sich annehmen, dass sich aufgrund der außerordentlichen Bedeutung der Apoptose für den Zelluntergang in der Infarktfrühphase hier ein entscheidendes Zeitfenster für die nichtinvasive Quantifizierung des Zelluntergangs und für den gewebekonservierenden Effekt therapeutischer Maßnahmen ergibt.

Bei der Untersuchung der Effektgröße im zeitlichen Verlauf in der Autoradiographie zeigte sich der größte Effekt zwischen 6 und 24 Stunden, in der μPET -Auswertung erst zwischen 24 und 48 Stunden. Zwischen den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden war dennoch ein großer Effekt messbar. Die beobachteten Effektstärken lassen die Schlussfolgerung zu, dass die erfassten maximalen Traceranreicherungen zu den beschriebenen Untersuchungszeitpunkten eine gute Grundlage für weitere Studien darstellen. Die beobachteten Effektstärken belegen die dynamische Veränderung und Abnahme der Apoptose im zeitlichen Verlauf. Deshalb muss bei Interventionsstudien in diesen Modellen der Zeitpunkt der Apoptose-Bildgebung genau definiert und eingehalten werden. Nur so können mögliche Änderungen im Apoptosesignal mit der Intervention korreliert werden.

Die beschriebenen Unterschiede zwischen Autoradiographie und μPET hinsichtlich des Zeitpunktes der maximalen Effektstärke sind möglicherweise auch auf die unterschiedlichen Auswertemethoden zurückzuführen. In der μPET wird die maximale Anreicherung in Abhängigkeit zur injizierten Aktivität betrachtet. In der Autoradiographie wird das Verhältnis zwischen dem

Infarktgebiet und dem nicht-infarzierten Remotemyokard beschrieben. Insgesamt deuten jedoch sowohl die μ PET- als auch die Autoradiographie-Ergebnisse darauf hin, dass im Modell der permanenten Ischämie das höchste Maß der Apoptose in der Initialphase des Myokardinfarktes stattfindet und dann an Tag 1 und 2 nach Induktion der Ischämie stetig nachlässt.

Um die Ergebnisse der μ PET und Autoradiographie besser interpretieren zu können, wurden ergänzende histologische Untersuchungen des Remotemyokards durchgeführt. Erwartungsgemäß sollte im Modell der permanenten Ischämie kaum Apoptose im Remotemyokard vorzufinden sein (110). Im Mehrfachvergleich war insgesamt kein signifikanter Unterschied hinsichtlich TUNEL-positiver Zellkernanschnitte zwischen den Zeitpunkten messbar.

Insgesamt zeigte sich im Modell der permanenten Ischämie, sowohl in der Autoradiographie als auch in der μ PET, ein stetig fallender Variationskoeffizient. Mit einem maximalen Wert von 13% zum Zeitpunkt 2 – 4 Stunden in der Autoradiographie und 68% zu dem Zeitpunkt 2 Stunden in der μ PET nahm der Variationskoeffizient in diesem Modell kontinuierlich ab. Dies reflektiert möglicherweise die heterogene Apoptosesituation zu den frühen Zeitpunkten.

2.2. Modell der transienten Ischämie

In der Autoradiographie zeigte sich im Modell der transienten Ischämie die höchste Mehranreicherung im Infarktareal im Verhältnis zum Remotemyokard zum ersten Zeitpunkt (2 Stunden). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in der μ PET mit der höchsten Traceranreicherung zum Zeitpunkt 2 Stunden. Autoradiographisch zeigte sich insgesamt ein weitgehend stabiler Verlauf innerhalb der ersten 24 Stunden mit einem Abfall erst an Tag 2 jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Der größte Effekt war zwischen 24 und 48 Stunden zu finden. Im Unterschied dazu wies der Welch-Test in der μ PET-Auswertung im Vergleich der Gruppen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der maximalen Infarktanreicherung auf. Weiterhin präsentierte sich ein signifikanter Abfall der Anreicherung im Infarktareal in der post-hoc Analyse vom Zeitpunkt 2 Stunden jeweils zu den späten Zeitpunkten 24 und 48 Stunden. Der größte Effekt war bereits zwischen den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden zu

finden. Außerdem ließ sich ein großer Effekt auch im Vergleich von 6 zu 24 Stunden feststellen. Im Modell der transienten Ischämie zeigten sich wie beschrieben deutlichere Unterschiede zwischen Autoradiographie und μ PET welche sich möglicherweise auch auf die unterschiedliche Auswertemethoden zurückzuführen lassen. Palojoki et al. und Oskarsson et al. konnten zeigen, dass Apoptose nicht nur im Infarktgebiet sondern auch im Remotemyokard, möglicherweise durch erhöhten oxidativen Stress bedingt, entstehen kann (34), (111). Reaktive Sauerstoffspezies können durch erhöhten oxidativen Stress vermehrt während des Myokardinfarktes entstehen und werden vermutlich durch die Reperfusion freigesetzt. Im Zuge dessen kann auch das Remotemyokard betroffen sein.

Um einen möglichen Einfluss der apoptotischen Zellen im Remotemyokard in der Autoradiographie-Auswertung beurteilen zu können, wurde die TUNEL-Methode herangezogen. Hierbei zeigte sich das Maximum der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte im Remotemyokard zum Zeitpunkt 2 Stunden und das Minimum zum Zeitpunkt 48 Stunden mit einem stetigen Abfall über die Zeit, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. Unter der Annahme, dass es einen direkten zeitlichen Zusammenhang zwischen der Apoptoserate im ischämischen Areal und dem Remotemyokard gibt, könnte dies eine Erklärung für ein methodenbedingtes, erniedrigtes Target-to-Background-Verhältnis in der Auswertung der Autoradiographie in diesem Modell darstellen.

Prinzipiell ist bekannt, dass die manuelle Infarktinduktion per Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* eine gute Vergleichbarkeit mit dem pathophysiologischen Infarktgeschehen zeigt, jedoch eine große Varianz der Infarktausdehnung und somit vermutlich auch der Apoptose besitzt (113). In der Methode der Autoradiographie stieg der Variationskoeffizient zum Zeitpunkt 2 - 4 Stunden von 19 % an und erreichte sein Maximum bei 6 Stunden mit 35 %. Entsprechend der Autoradiographie-Ergebnisse wiesen die frühen Zeitpunkte 2, 4 und 6 Stunden in der μ PET-Auswertung große Variationskoeffizienten innerhalb der Gruppen, mit einem Maximum zum Zeitpunkt 6 Stunden von 154 % auf. Der im Verhältnis zur μ PET-Auswertung niedrigere Variationskoeffizient der Autoradiographie-Auswertung könnte, wie bereits zuvor diskutiert, partiell auf die unterschiedliche Auswertemethode zurückzuführen sein.

Eine erhöhte, individuelle Varianz konnte ebenso für die am Myokardinfarkt

beteiligten Zytokine nach operativer Erzeugung eines Myokardinfarktes mit anschließender Reperfusion festgestellt werden (114). Es ist beispielsweise das Zytokin Interleukin-6 zu nennen, welches die kompensatorische Hypertrophie fördert, kardioprotektiv wirkt und der Apoptose nach Reperfusion entgegen wirkt (15). Dem gegenüber stehen Zytokine, wie zum Beispiel der Tumor Nekrose Faktor α , welche unter anderem im Zuge eines Myokardinfarktes Apoptose induzieren können (4). Somit deutete möglicherweise die erhöhte Varianz der Zytokine nach Reperfusion ebenfalls auf eine erhöhte Varianz der Apoptose in diesem Ischämie-Modell hin.

Im Allgemeinen sollten individuelle Unterschiede der Einzeltiere in Bezug auf die Ausprägung der Apoptose im Verlauf des Infarktes, entstehend auf Grund der Reperfusion, in diesem Modell berücksichtigt werden. Das ist insofern wesentlich, da das transiente Ischämie-Modell bereits einer erfolgten Intervention nach akutem Myokardinfarkt durch Reperfusion entspricht (116). Der individuelle Unterschied spiegelte sich im hohen Variationskoeffizienten wie beschrieben wider, mit einem Maximum bei 6 Stunden für beide Methoden, Autoradiographie und μ PET-Messung.

2.3. Vergleich beider Ischämie-Modelle

Beim Vergleich der permanenten und transienten Ischämie zeigte sich zu den frühen 2 – 4 Stunden Zeitpunkten ein signifikant höheres Target-to-Background-Verhältnis im Modell der permanenten Ischämie. Wie bereits erwähnt, sollte das höchste Maß der Apoptose erwartungsgemäß nach einer transienten Ischämie zu finden sein (118). Der absolut gesehen erniedrigte Wert in der Autoradiographie-Auswertung nach transientscher Ischämie lässt sich am ehesten methodenbedingt erklären. Werden bei der Interpretation der Ergebnisse die Auswertung der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte im Remotemyokard hinzugezogen, wird die Vermutung weiter bekräftigt. Hier zeigte sich im Vergleich der kombinierten, frühen Zeitpunkte (2 – 6 Stunden) eine signifikant höhere Anzahl TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Modell der transienten Ischämie, also im Background der Autoradiographie-Auswertung. Dies führte wahrscheinlich zu einer Unterschätzung der Apoptoserate im Modell der transienten Ischämie. In Betrachtung der μ PET-Ergebnisse zeigte sich in den zusammengefassten

Zeitpunkten (2 – 6 Stunden) im Modell der transienten Ischämie eine signifikant höhere Anreicherung im Infarktgebiet als Zeichen einer erhöhten Apoptoserate. Dies konnte bereits durch Chiong et al. 2011 gezeigt werden (3). Es wurde mehrfach beschrieben, dass sich im Modell der transienten Ischämie Apoptose vermehrt in subletal geschädigtem Gewebe und im Periinfarkt-Gebiet findet (119), (120). Darüber hinaus werden über den Reperfusionsschaden weitere Zellen geschädigt, welche möglicherweise per Apoptose in den Zelltod übergehen. Nekrose läuft während und nach einem Myokardinfarkt am ehesten dort ab, wo keine vaskuläre Versorgung mehr vorzufinden ist (118). Da die Apoptose ein Sauerstoff-konsumierender Prozess ist und nach permanenter Ischämie keine oder kaum mehr Versorgung stattfindet, ist hier primär Nekrose zu erwarten. Dem entsprechend sollte die Anzahl an apoptotischen Zellen im transienten größer als im permanenten Ischämie-Modell sein. In beiden Modellen zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Anreicherung bzw. der Apoptose zu den späten Zeitpunkten. Auch wenn sich im Modell der transienten Ischämie zum späten 48 Stunden Zeitpunkt eine signifikant höhere Anreicherung in der μ PET-Auswertung als im permanenten Ischämie-Modell zeigt, ist diese auf einem sehr niedrigen Niveau.

Im Vergleich der Modelle hinsichtlich der Effektstärke, zeigte sich das Modell der permanenten Ischämie in der Autoradiographie mit dem größten Effekt zwischen 6 und 24 Stunden. Jeder Vergleich in diesem Modell zwischen den weiteren Zeitpunkten zeigte ebenfalls einen großen Effekt. Dies traf auf das Modell der transienten Ischämie nicht zu. In zukünftigen Interventionsstudien gilt es zu berücksichtigen, dass bei größeren Effekten der Vergleichsgruppe auch kleinere Effekte in der Therapiegruppe wahrscheinlich messbar sein werden. Betrachtet man die Variationskoeffizienten in beiden Modellen, so zeigt sich, sowohl in der Autoradiographie als auch in der μ PET eine deutlich höhere Variation im Modell der transienten Ischämie. Wie bereits durch Happe et al. beschrieben wurde, ist eine gute Vergleichbarkeit der Ischämie-Modelle mit dem pathophysiologischen Infarktgeschehen gegeben, jedoch zeigte sich eine große Varianz der Infarktausdehnung und somit vermutlich des Maß der Apoptose (113). Im Modell der permanenten Ischämie entsteht möglicherweise eine einheitlichere Situation als in dem der transienten Ischämie bezüglich des Ablaufes der Apoptose im Anschluss an einen Myokardinfarkt. (114). Daher werden in einem Modell mit

großen Variationskoeffizienten und mittleren Effektgrößen, wie hier im Modell der transienten Ischämie, nur größere Effekte von Interventionstherapien messbar sein.

Generell sollte auch bedacht werden, dass bereits innerhalb kurzer Zeitdifferenzen (in dieser Studie 2 Stunden) große Effekte im Maß der Apoptose in beiden Ischämie-Modellen zustande kommen. Daher sollte genauestens definiert werden, zu welchem Zeitpunkt im gewählten Ischämie-Modell eine Interventionstherapie evaluiert wird. Ebenso gilt es zu betonen, dass der Zeitpunkt der Messung nach myokardialer Ischämie der Vergleichsgruppe genau mit dem der Interventionsgruppe übereinstimmen sollte.

Im Modell der permanenten Ischämie zeichnete sich der Zeitpunkt 6 Stunden sowohl in der Autoradiographie als auch in der μ PET-Auswertung mit einem großen Effekt aus, gefolgt von einer signifikanten Signalminderung zu späteren Zeitpunkten. Obwohl das Signal zu früheren Zeitpunkten größer war, sollte der Zeitpunkt 6 Stunden mit einen geringeren Variationskoeffizienten gewählt werden.

Trotz der vorhandenen großen Individualität des Maßes der Apoptose innerhalb der Gruppen der transienten Ischämie, stellte sich der Zeitpunkt 2 Stunden in diesem Modell am ehesten als geeignet für eine weitere Verwendung hinsichtlich möglicher weiterführender Studien dar. Weil et al. konnten zeigen, dass nach kurzer Ischämie (= 10 Minuten) und anschließender Reperfusion, bereits nach 60 Minuten Kardiomyozyten in Form von Apoptose in diesem Modell untergingen (117). In Übereinstimmung zeichnete sich in dieser Studie zum Zeitpunkt 2 Stunden in der Auswertung der μ PET-Messung das maximale Signal und der größte Effekt der Signaländerung ab. Dies spiegelte sich in einer signifikant höheren Anreicherung im Vergleich zu späteren Zeitpunkten wider. Im Gegensatz zum permanenten Ischämie-Modell stieg hier zunächst die Varianz bis zum Zeitpunkt 6 Stunden an und nahm zu den späten Zeitpunkten wieder ab.

3. Limitationen

In der Auswertung der μ PET-Daten konnte in dieser Studie die Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im Infarktgebiet dargestellt werden. Eine Einschränkung stellte hier jedoch der invasive Zugangsweg zur Erzeugung des Infarktes, sowie vermutlich die Beatmung per Intubation dar. Hierdurch wurde weitere Apoptose und somit eine zusätzliche Anreicherung des Tracers im angrenzenden Gewebe der Lunge nahe dem zu untersuchenden Gebiet erzeugt. Es ergab sich durch diese Anreicherung eine restriktive Auswertungsmöglichkeit, sodass die VOI derart gewählt werden musste, dass die Anreicherung des angrenzenden Gewebes nicht miterfasst wurde. Die Anreicherung im Bereich des Zugangsweges wurde auch bei Ma et al. beschrieben, jedoch nicht die Anreicherung im Bereich der Lunge (108). Ma et al. verwendeten in dieser Studie Ratten zur Untersuchung der permanenten Ischämie. Im Zuge der Studie zur Beatmung per Intubation der Maus durch Römer et al. konnten in histologischen Präparaten jeweils Atelektasen, perivaskuläre Ödeme sowie Stauungen und Emphyseme in der Lunge festgestellt werden (121). Bisher wurde nicht genau nachgewiesen, worauf diese Befunde zurückzuführen waren. Möglicherweise stellt hier eine Überarbeitung des starren Intubationssystems, momentan basierend auf einem Metalltubus, eine interessante Weiterentwicklungsmöglichkeit dar.

Da keine direkt mit [^{18}F]-ML10 vergleichbar arbeitende histologische Methode zur Verfügung steht, wurde für die Darstellung der Apoptose die TUNEL-Methode gewählt. Es können Zellen, die bereits eine DNA-Spaltung zeigen, markiert werden, noch bevor sie morphologisch als apoptotisch zu erkennen sind (20). Generell stellt die TUNEL-Methode eine weit verbreitete und viel genutzte Methode in der Darstellung der Apoptose dar. Beispielsweise verwendeten Ohno et al. die TUNEL-Methode zur Darstellung der Apoptose im transienten Ischämie-Modell bei Kaninchen (123). [^{18}F]-ML10 soll in der Frühapoptose bereits ab der ersten Veränderung des Membranpotentials apoptotische Zellen detektieren können und zu diesem Zeitpunkt ist ein DNA laddering entsprechend der Markierung durch die TUNEL-Färbung nicht zwingend vorhanden. Ferner ist die TUNEL-Methode nicht zu 100 % spezifisch für Apoptose, da sowohl Onkose als auch Apoptose in Nekrose als Form des Ablaufes nach dem Zelltod übergehen können (122). Unter anderem kann in diesen Fällen DNA im laddering pattern vorliegen (19). Ebenso werden nicht nur Kardiomyozyten, die das bei der

Apoptose vorliegende DNA laddering pattern aufweisen, angefärbt, sondern auch andere Zellen im Herzen wie zum Beispiel Endothelzellen. Da die Auswertung hier jedoch manuell und nicht computergesteuert stattfand, konnte sichergestellt werden, dass Gesichtsfelder ausschließlich im Myokardbereich lagen und die Genauigkeit der Auswertung dahingehend nicht beeinflusst wurde (18).

In der Auswertung der TUNEL-positiven Zellkernanschnitten im Remotemyokard in dieser Studie handelte es sich nicht um eine TUNEL-positive Färbung innerhalb eines gesamten Kardiomyozyten. Vielmehr stellten diese einen Anteil der Zellkerne eines Kardiomyozyten dar. Dies konnte ebenfalls von Rodriguez-Calvo et al. festgestellt werden (124). Möglicherweise sind Zellen im Infarktgebiet ganzheitlich auf Grund der vorherrschenden Bedingungen betroffen, jedoch im Remotemyokard nur einzelne Zellkerne, was eventuell zu einer Einschränkung in der jeweiligen Funktionalität führen könnte. In einer Auswertung im Target-to-Background-Verhältnis wäre eine Beeinflussung des Verhältnisses durch Apoptose im Remotemyokard, vor allem im Modell der transienten Ischämie, denkbar und sollte, wie bereits beschrieben, als mögliche Überlegung in die Auswertung der Ergebnisse mit einfließen. Aufgrund der angewandten Methode und der Festlegung der ausgewerteten Gesichtsfelder im Septum-Remotemyokard, ist weiterhin keine Aussage zur Anzahl der apoptotischen Zelluntergänge im gesamten Remotemyokard möglich. Durch die Zählung der Zellkernanschnitte pro Schnittfläche ist keine Relation der Zellzahl pro Volumeneinheit zum Myokard oder zum gesamten Herzvolumen möglich.

Es ist hier noch einmal der explorative Charakter dieser Studie zu nennen, bei welcher eine geringe Tierzahl zur Darstellung erster Effekte zur Verfügung stand. Ebenfalls sei auf die Möglichkeit der Messung lediglich in einer zeitlichen Abfolge hingewiesen, da jedes Tier einem Zeitpunkt zugeordnet und im Anschluss zur Herzentnahme geopfert wurde. Interessant wäre darüber hinaus die Betrachtung eines Tieres mit [^{18}F]-ML10 μPET im zeitlichen Verlauf, also die Messung in serieller Abfolge zur Darstellung der Entwicklung der myokardialen Apoptose über einen längeren Zeitraum.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Molekulare Bildgebung mittels [^{18}F]-ML10 zur Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der kardialen Apoptose im Ischämie-Modell der Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde der Tracer [^{18}F]-ML10 zur Bestimmung der Apoptose im kardiologischen Ischämie-Modell der Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt verwendet. Es wurde der Zeitpunkt mit einem großen Effekt und gleichzeitig geringem Variationskoeffizienten ermittelt, welcher sich als Referenz für Interventionstherapien eignet.

Zunächst wurde die Eignung von [^{18}F]-ML10 bezüglich der Darstellbarkeit von Apoptose nach Myokardinfarkt beurteilt und für gegeben bewertet. Sowohl in der Methode der Autoradiographie als auch in der μPET -Messung reicherte der Tracer im Versorgungsgebiet des *Ramus interventricularis anterior* nach Myokardinfarkt an. Ferner zeigte sich in der Co-Registrierung der [^{18}F]-ML10 μPET -Messung zur Bildgebung mittels [^{18}F]-FDG eine Übereinstimmung der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 mit dem infarzierten Bereich. Es konnte kaum bis keine Anreicherung im nicht-infarzierten Bereich in beiden Methoden festgestellt werden. Durch die operative Infarktinduktion, sowie durch die intraoperative Intubation im Ischämie-Modell der Maus kam es in dieser Studie zu einer Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im operativen Zugangsweg sowie in der Lunge. Eventuell ist hier eine Verbesserung des OP-Modelles sowie der Intubationsmöglichkeit der Maus nötig.

Das Maximum des Maßes der Apoptose zeigte sich sowohl im kardiologischen Modell der permanenten sowie transienten Ischämie jeweils in der Methode der Autoradiographie und der μPET -Messung wie erwartet zum frühen Zeitpunkt (2 Stunden) nach Myokardinfarkt.

Es fand sich im Modell der transienten Ischämie zum Zeitpunkt 2 Stunden auch der größte Effekt der Signaländerung und eine signifikant höhere Anreicherung im Vergleich zu späteren Zeitpunkten. Dieses Modell entspricht bereits einer erfolgten Intervention nach akutem Myokardinfarkt, dies spiegelt sich in dem bis zum Zeitpunkt 6 Stunden ansteigendem, hohen Variationskoeffizienten wider.

Erst zu den späten Zeitpunkten nahm dieser wieder ab. In einem Modell wie diesem mit hohen Variationskoeffizienten, werden vornehmlich größere Effekte von Interventionstherapien messbar sein.

Im Modell der permanenten Ischämie zeichnete sich der Zeitpunkt 6 Stunden sowohl in der Autoradiographie als auch in der μ PET-Auswertung mit einem großen Effekt aus, unterstützt von einem signifikant höheren Signal im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten. Obwohl das Signal zu früheren Zeitpunkten größer war, sollte der Zeitpunkt 6 Stunden mit einem geringeren Variationskoeffizienten gewählt werden. Es ergibt sich in diesem Modell zu diesem Zeitpunkt am ehesten eine stabile Vergleichsgruppe für Interventionsstudien, bei welcher wahrscheinlich auch kleine Effekte in Therapiegruppen messbar werden.

Allgemein sollte für den jeweiligen Untersuchungszweck genauestens definiert werden, zu welchem Zeitpunkt im gewählten Ischämie-Modell eine Interventionstherapie evaluiert wird. Zudem sollte der Messzeitpunkt zwischen Vergleichsgruppe und Interventionsgruppe exakt übereinstimmen da diese Studie gezeigt hat, dass innerhalb kurzer Zeit große Effekte in der Signaländerung in beiden Ischämie-Modellen zustande kommen.

Die autoradiographische Auswertung im Target-to-Background-Verhältnis ergab ein geringeres Verhältnis der Anreicherung im Modell der transienten Ischämie im Vergleich zur permanenten Ischämie zu den frühen Zeitpunkten. Zu erwarten gewesen wäre jedoch eine höhere Anreicherung in dem Modell der transienten Ischämie. In der Auswertung der TUNEL-Methode zeigte sich im Modell der transienten Ischämie ein signifikant höherer prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard im Vergleich zur permanenten Ischämie. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise eine Erklärung für ein verändertes Verhältnis in einer Target-to-Background Auswertung darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher für die spezifische Darstellung der kardialen Apoptose keine in vivo Methode verfügbar ist und [^{18}F]-ML10 in dieser Studie geeignet erschien, Apoptose nach Myokardinfarkt darzustellen.

VIII. SUMMARY

Molecular Imaging Using [^{18}F]-ML10 to Assess the Time Course of Cardiac Apoptosis in Mouse Ischemia Model

In the present study the tracer [^{18}F]-ML10 was used to assess the degree of apoptosis in a mouse cardiac ischemic model at various time points after myocardial infarction. In addition, a time point with a large effect and low coefficient of variation as a reference for intervention-therapy was chosen.

We found [^{18}F]-ML10 to be suitable for visualizing apoptosis following myocardial infarction. Using autoradiography and μPET -Imaging, the tracer [^{18}F]-ML10 was found in the supply area of the *Ramus interventricularis anterior* and therefore in the area of myocardial infarction. Its location in the μPET images showed a correspondence to the co-registered area of myocardial infarction in the [^{18}F]-FDG images. Very little to no accumulation could be detected in the non-infarcted area using either method. In this study, both the induction of myocardial infarction and the intraoperative intubation of the mouse led to an accumulation of the tracer in the access path, as well as in the lung. Further research would benefit from an improvement of the mouse cardiac ischemic model, as well as of the technique of intubation.

As expected, the maximum degree of apoptosis was shown to occur at the early time point, 2 hours after myocardial infarction in both the model of permanent and the model of transient ischemia, using either method of measurement.

The biggest effect in the model of transient ischemia as well as a significant accumulation of [^{18}F]-ML10 in comparison to the late time points was seen at the early time point of 2 hours. The coefficient of variation rose to the time point of 6 hours most likely because this model itself works as an intervention after myocardial infarction. In this model with a high coefficient of variation effects in intervention-therapy will have to be large to be detected.

In autoradiographic as well as in μPET evaluation the time point of 6 hours in the model of permanent ischemia has shown big effects. It also had a significantly higher accumulation than the later time points. Although the early time points

have shown a higher accumulation, we would recommend the time point of 6 hours, because of the lower coefficient of variation. It is the most stable of the early time points with still enough accumulation for comparison of a baseline-group with an intervention-group. If this model is chosen it is most likely to still see effects of interventions-therapy even if they are small.

The choice of the cardiac ischemia model and the time point following infarction to be studied should wisely be chosen considering the respective purpose of investigation. As shown in this study, there can already be a large effect in the comparison of the accumulation over a short period of time in both models of ischemia, therefore the time point of baseline- an intervention-group should match exactly.

However, especially in the model of transient ischemia, a high inter-individual variability in the accumulation of [^{18}F]-ML10 was found at the early time points 2 - 6 hours after myocardial infarction. Using Cohen's d value between 6 hours and the other time points large effects were seen in the comparison of the accumulation of [^{18}F]-ML10. Therefore, measurements 6 hours after myocardial infarction, with a lower individual coefficient of variation than 2 – 4 hours, may be suitable for use in future studies. Myocardial infarct induction in the model of the mouse is known to show good comparability with the pathophysiology of the human patient but greater variability in the severity of the infarction. The choice of the cardiac ischemia model and the time point following infarction to be studied may therefore change with the respective purpose of investigation.

The autoradiographic evaluation of the target-to-background-ratio at early time points revealed a lower ratio in the model of transient than in the model of permanent ischemia. However, a higher accumulation would have been expected to occur with transient ischemia. Comparing the evaluation of the results of the TUNEL-method, the model of transient ischemia showed a significantly higher percentage of TUNEL-positive nucleus sections in the remote myocardium than the model of permanent ischemia. This result may explain a changed ratio in the target-to-background evaluation owing to increased background signal.

In conclusion, in this study [^{18}F]-ML10 appears to be a suitable tracer in the first in-vivo method for imaging apoptosis following myocardial infarction.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. European Commission [Eurostat]. Heart diseases and strokes cause over 1.8 million deaths in the EU 2017[20.08.18] [Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/EDN-20170928-1>].
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). Sterbefälle 2015 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10 2018 [09.09.18], [Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>].
3. Chiong M, Wang Z, Pedrozo Z, Cao D, Troncoso R, Ibacache M, et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease*. 2011;2(12):e244.
4. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
5. Chandrashekhar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I. Long-Term Caspase Inhibition Ameliorates Apoptosis, Reduces Myocardial Troponin-I Cleavage, Protects Left Ventricular Function, and Attenuates Remodeling in Rats with Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(2):295-301.
6. Gill C, Mestril R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target? *The FASEB Journal*. 2002;16(2):135-46.
7. Guglielmini C. Cardiovascular Diseases in the Ageing Dog: Diagnostic and Therapeutic Problems. *Veterinary research communications*. 2003;27(1):555-60.
8. Driehuys S, Van Winkle TJ, Sammarco CD, Drobatz KJ. Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994). *JOURNAL-AMERICAN*

VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. 1998;213:1444-8.

9. Beuckelmann D, Böhm M, Hanrath P, Meyer J, Steinbeck G. Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße: Springer Verlag; 2013.
10. Rischpler C, Nekolla SG, Dregely I, Schwaiger M. Hybrid PET/MR Imaging of the Heart: Potential, Initial Experiences, and Future Prospects. *Journal of Nuclear Medicine*. 2013;54(3):402-15.
11. McMurray J, Pfeffer MA. New Therapeutic Options in Congestive Heart Failure: Part I. *Circulation*. 2002;105(17):2099-106.
12. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2001/2002;31(4):214-23.
13. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. APOPTOSIS IN THE FAILING HUMAN HEART. *The New England Journal of Medicine*. 1997;336(16):1131-41.
14. Ganten DR, Klaus. *Grundlagen der Molekularen Medizin Kapitel 1.8 Molekulare Grundlagen der Apoptose*. 3.Auflage ed: Springer Verlag; 2008.
15. Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. Molecular Mechanisms in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(9 Supplement):A56-A66.
16. Riedl SJ, Shi Y. MOLECULAR MECHANISMS OF CASPASE REGULATION DURING APOPTOSIS. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(11):897.
17. Geske F, Lieberman R, Strange R, Gerschenson L. Early stages of p53-

induced apoptosis are reversible. Cell death and differentiation. 2001;8(2):182.

18. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, et al. Myocyte Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in the Mouse Localizes to Hypoxic Regions but Occurs Independently of p53. The Journal of Clinical Investigation. 1997;100(6):1363-72.

19. Buja LM, Entman ML. Modes of Myocardial Cell Injury and Cell Death in Ischemic Heart Disease. Am Heart Association; 1998.

20. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion Injury Induces Apoptosis in Rabbit Cardiomyocytes. Journal of Clinical Investigation. 1994;94(4):1621.

21. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. Drug Resistance Updates. 2007;10(1):13-29.

22. De Saint-Hubert M, Prinsen K, Mortelmans L, Verbruggen A, Mottaghy FM. Molecular imaging of cell death. Methods. 2009;48(2):178-87.

23. Dietz R, Rauch B. Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie–Herz-und Kreislaufforschung (DGK). Zeitschrift für Kardiologie. 2003;92(6):501-21.

24. Steffel J, Luescher T. Herz-Kreislauf: Springer Verlag; 2014.

25. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. The Journal of clinical investigation. 2013;123(1):92.

26. Schwaiger M, Brunken R, Grover-McKay M, Krivokapich J, Child J, Tillisch JH, et al. Regional Myocardial Metabolism in Patients With Acute Myocardial Infarction Assessed By Positron Emission Tomography. Journal of

the American College of Cardiology. 1986;8(4):800-8.

27. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. Cardiovascular Research. 2008.
28. Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. Apoptosis. 2006;11(10):1709-26.
29. Holtz J, Zimmer H. Einfluss von zyklischer mechanischer Dehnung auf den Untergang von adulten Ventrikelmyozyten in Abhängigkeit vom Alter. 2004.
30. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte Feath, Growth, and Regeneration in Cardiac Hypertrophy and Failure. Circulation research. 2003;92(2):139-50.
31. Baldauf K. Charakterisierung der Kardiomyopathien bei 106 Katzen mit diagnostizierter Myokarderkrankung. 2013.
32. Scarabelli T, Gottlieb R. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions. Cell death and differentiation. 2004;11(S2):S144.
33. Lehner S, Todica A, Vanchev Y, Uebleis C, Wang H, Herrler T, et al. In Vivo Monitoring of Parathyroid Hormone Treatment after Myocardial Infarction in Mice with [68Ga] Annexin A5 and [18F] Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. Molecular imaging. 2014;13(10):7290.2014. 00035.
34. Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki L-M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2001;280(6):H2726-H31.

35. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, et al. Programmed Myocyte Cell Death Affects the Viable Myocardium after Infarction in Rats. *Experimental cell research*. 1996;226(2):316-27.
36. Thimister PW, Hofstra L, Liem H, Boersma HH, Kemerink G, Reutelingsperger CP, et al. In Vivo Detection of Cell Death in the Area at Risk in Acute Myocardial Infarction. *Journal of Nuclear Medicine*. 2003;44(3):391-6.
37. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in Ischemic and Reperfused Rat Myocardium. *Circulation Research*. 1996;79(5):949-56.
38. Piper H, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):365-71.
39. Zhao Z-Q, Nakamura M, Wang N-P, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research*. 2000;45(3):651-60.
40. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, et al. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2010;61(2):163-70.
41. Gross L, Paintmayer L, Lehner S, Brandl L, Brenner C, Grabmaier U, et al. FDG-PET reveals improved cardiac regeneration and attenuated adverse remodelling following Sitagliptin+ G-CSF therapy after acute myocardial infarction. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging*. 2015;17(2):136-45.
42. Gropler RJ, Beanlands RS, Dilsizian V, Lewandowski ED, Villanueva FS, Ziadi MC. Imaging Myocardial Metabolic Remodeling. *Journal of Nuclear Medicine*. 2010;51(Supplement 1):88S-101S.
43. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et

al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(3):407-14.

44. Kosanke K. Zum Einfluss von pluripotenten hämatopoetischen Knochenmarkszellen auf den Apoptoseverlauf nach experimentellen Myokardinfarkt - in vivo Untersuchungen mittels molekular Fluoreszenz - und Computertomographie am Mausmodell: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2013.

45. Vallaster M. Verbesserung der kardialen Pumpfunktion und des Überlebens nach induziertem Myokardinfarkt im Mausmodell über eine durch CD26-/DPPIV-Inhibition und G-CSF-Therapie stimulierte Ansiedelung von Knochenmarksstammzellen ("Stammzellhoming") im Herzen: Ludwig-Maximilians-Universität; 2012.

46. Schlüter K-D, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovascular Research*. 1998/97;37(1):34-41.

47. Gruson D, Ahn SA, Rousseau MF. Multiple biomarker strategy based on parathyroid hormone and natriuretic peptides testing for improved prognosis of chronic heart failure. *Peptides*. 2015;64:24-8.

48. Duplain H. Salvage of ischemic myocardium: a focus on JNK. *Advances in experimental medicine and biology*. 2006;588:157.

49. Wienhard K, Wagner R, Heiss W-D. PET: Grundlagen und Anwendungen der Positronen-emissions-tomographie: Springer Verlag; 2013.

50. Kiessling F, Pichler BJ, Hauff P. *Small Animal Imaging*: Springer Verlag; 2016.

-
51. Krukemeyer M, Wagner W. Strahlenmedizin: Ein Leitfaden für den Praktiker Kapitel 7 PET Positronen-Emissions-Tomographie. In: Bender H, Biersack H, editors.: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG 2004. p. S. 123 -44.
52. Turkington TG. Introduction to PET instrumentation. Journal of nuclear medicine technology. 2001;29(1):4-11.
53. Kehren F. Vollständige iterative Rekonstruktion von dreidimensionalen Positronen-Emissions-Tomogrammen unter Einsatz einer speicherresidenten Systemmatrix auf Single-und Multiprozessor-Systemen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen 2001.
54. Stegger L, Heijman E, Schäfers KP, Nicolay K, Schäfers MA, Strijkers GJ. Quantification of Left Ventricular Volumes and Ejection Fraction in Mice Using PET, Compared with MRI. Journal of Nuclear Medicine. 2009;50(1):132-8.
55. Roskamm H, Reindell H. Herzkrankheiten: Pathophysiologie Diagnostik Therapie: Springer Verlag; 2013.
56. Gallowitsch H, Gomez I, Igerc I, Kresnik E, Kumnig G, Lind P, et al. PET in der Kardiologie. Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology. 2003;10(5):183-8.
57. Lehner S, Todica A, Brunner S, Uebleis C, Wang H, Wängler C, et al. Temporal Changes in Phosphatidylserine Expression and Glucose Metabolism after Myocardial Infarction: An In Vivo Imaging Study in Mice. Molecular imaging. 2012;11(6):7290.2012. 00010.
58. Iskandrian AE, Garcia EV. NUCLEAR CARDIAC IMAGING Kapitel 1.CARDIOLOGY HISTORY AND MILESTONES. In: Zaret B, editor. 5.Auflage ed: Oxford University Press; 2015.
59. Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, et al.

Impact of Animal Handling on the Results of 18F-FDG PET Studies in Mice. Journal of Nuclear Medicine. 2006;47(6):999.

60. Todica A, Böning G, Lehner S, Weidl E, Cumming P, Wängler C, et al. Positron emission tomography in the assessment of left ventricular function in healthy rats: A comparison of four imaging methods. Journal of Nuclear Cardiology. 2013;20(2):262-74.

61. Higuchi T, Nekolla SG, Jankaukas A, Weber AW, Huisman MC, Reder S, et al. Characterization of Normal and Infarcted Rat myocardium Using a Combination of Small-Animal PET and Clinical MRI. Journal of Nuclear Medicine. 2007;48(2):288-94.

62. Lang CI, Krause BJ, David R. Cardiac FDG-PET: a straight forward tool with high potential. Oxford University Press; 2016.

63. Vanchev YP. Die Messung von Apoptose und kardialer Funktion mittels PET nach Parathormon-Behandlung im murinen Myokardinfarktmodell: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2014.

64. Schäfers KP, Stegger L, Barnard C, Kriens M, Hermann S, Schober O, et al. ECG-triggered high-resolution positron emission tomography: a breakthrough in cardiac molecular imaging of mice. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. 2005;32(3):383-.

65. Brunner S, Todica A, Böning G, Nekolla SG, Wildgruber M, Lehner S, et al. Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [¹⁸F] FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. EJNMMI research. 2012;2(1):43.

66. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Petretta MP, Ferro A, Larobina M, et al. PET/CT Imaging in Mouse Models of Myocardial Ischemia. BioMed Research International. 2012;2012.

67. Stegger L, Hoffmeier A-N, Schäfers KP, Hermann S, Schober O, Schäfers MA, et al. Accurate Noninvasive Measurement of Infarct Size in Mice with High-Resolution PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 2006;47(11):1837-44.
68. Greco A, Petretta MP, Larobina M, Gargiulo S, Panico M, Nekolla SG, et al. Reproducibility and accuracy of non-invasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET/CT. *Journal of Nuclear Cardiology*. 2012;19(3):492-9.
69. Chareonthaitawee P, Schaefer K, Baker CS, Turkheimer F, Stegger L, Banner NR, et al. Assessment of infarct size by positron emission tomography and [18F] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: a new absolute threshold. *European journal of nuclear medicine*. 2002;29(2):203-15.
70. Reshef A, Shirvan A, Akselrod-Ballin A, Wall A, Ziv I. Small-Molecule Biomarkers for Clinical PET Imaging of Apoptosis. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2010;51(6):837-40.
71. Thompson CB. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science*. 1995;267(5203):1456.
72. Neves AA, Brindle KM. Imaging Cell Death. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2014;55(1):1-4.
73. Tait JF. Imaging of Apoptosis. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(10):1573-6.
74. Grimberg H, Levin G, Shirvan A, Cohen A, Yogev-Falach M, Reshef A, et al. Monitoring of tumor response to chemotherapy in vivo by a novel small-molecule detector of apoptosis. *Apoptosis*. 2009;14(3):257-67.
75. Chopra A. 2-(5-[18F] Fluoro-pentyl)-2-methyl-malonic acid (ML-10). *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. 2012.

76. Cohen A, Shirvan A, Levin G, Grimberg H, Reshef A, Ziv I. From the Glia domain to a novel small-molecule detector of apoptosis. *Cell Research*. 2009;19(5):625-37.
77. Yagle KJ, Eary JF, Tait JF, Grierson JR, Link JM, Lewellen B, et al. Evaluation of 18F-annexin V as a PET Imaging Agent in an Animal Model of Apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2005;46(4):658-66.
78. Allen AM, Ben-Ami M, Reshef A, Steinmetz A, Kundel Y, Inbar E, et al. Assessment of response of brain metastases to radiotherapy by PET imaging of apoptosis with 18F-ML-10. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012;39(9):1400-8.
79. Höglund J, Shirvan A, Antoni G, Gustavsson S-Å, Långström B, Ringheim A, et al. 18F-ML-10, a PET Tracer for Apoptosis: First Human Study. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2011;52(5):720-5.
80. Bauwens M, De Saint-Hubert M, Cleynhens J, Vandeputte C, Li J, Devos E. In vitro and in vivo comparison of 18F and 123I-labeled ML10 with 68Ga-Cys2-AnxA5 for molecular imaging of apoptosis. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of*. 2013;57(2):187-200.
81. Reshef A, Shirvan A, Waterhouse RN, Grimberg H, Levin G, Cohen A, et al. Molecular Imaging of Neurovascular Cell Death in Experimental Cerebral Stroke by PET. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(9):1520-8.
82. Hyafil F, Tran-Dinh A, Burg S, Leygnac S, Louedec L, Milliner M, et al. Detection of Apoptotic Cells in a Rabbit Model with Atherosclerosis-Like Lesions Using the Positron Emission Tomography Radiotracer [18F] ML-10. *Molecular imaging*. 2015;14(8):7290.2015. 00017.
83. Simpson KL, Cawthorne C, Zhou C, Hodgkinson CL, Walker MJ, Trapani

F, et al. A caspase-3 'death-switch' in colorectal cancer cells for induced and synchronous tumor apoptosis in vitro and in vivo facilitates the development of minimally invasive cell death biomarkers. *Cell Death & Disease*. 2013;4(5):e613.

84. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *THE LANCET Oncology*. 2008;9(10):1002-11.

85. Meyn RE, Milas L, Ang KK. The role of apoptosis in radiation oncology. *International Journal of Radiation Biology*. 2009;85(2):107-15.

86. Oborski MJ, Laymon CM, Lieberman FS, Drappatz J, Hamilton RL, Mountz JM. First use of 18F-labeled ML-10 PET to assess apoptosis change in a newly diagnosed glioblastoma multiforme patient before and early after therapy. *Brain and Behavior*. 2014;4(2):312-5.

87. Oborski MJ, Laymon CM, Qian Y, Lieberman FS, Nelson AD, Mountz JM. Challenges and Approaches to Quantitative Therapy Response Assessment in Glioblastoma Multiforme Using The Novel Apoptosis Positron Emission Tomography Tracer F-18 ML-10. *Translational oncology*. 2014;7(1):111-9.

88. Sun L, Zhou K, Wang W, Zhang X, Ju Z, Qu B, et al. [18F] ML-10 Imaging for Assessment of Apoptosis Response of Intracranial Tumor Early after Radiotherapy by PET/CT. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2018;2018.

89. Glocker R, Macherauch E. Röntgen-und Kernphysik für Mediziner und Biophysiker: Georg Thieme Verlag; 1965.

90. Thie JA. Nuclear Medicine Imaging: An Encyclopedic Dictionary: Springer Verlag; 2012.

91. Tritthart HA, DeVaney T. Physik und Biophysik für Mediziner: Schattauer Verlag; 2011.

92. Salto-Tellez M, Lim SY, El Oakley RM, Tang TPL, ALmsherqi ZAM, Lim S-K. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovascular Pathology*. 2004;13(2):91-7.
93. Van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Nederhoff MG, Ward-van Oostwaard D, Field LJ, et al. Monitoring of cell therapy and assessment of cardiac function using magnetic resonance imaging in a mouse model of myocardial infarction. *Nature protocols*. 2007;2(10):2551.
94. Schmidt MU. Einfluss von Östrogen auf den Akt/mTOR-und Erk-Signalweg bei adaptiver Herzhypertrophie in vitro. 2015.
95. Falk T, Jönsson L. Ischaemic heart disease in the dog: a review of 65 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 2000;41(3):97-103.
96. Mete A, McDonough S. Epicardial Coronary Artery Fibromuscular Dysplasia, Myocardial Infarction and Sudden Death in a Dog. *Journal of comparative pathology*. 2011;144(1):78-81.
97. Nelson RW, Couto CG, Holtermann H. *Innere Medizin der Kleintiere*: Elsevier, Urban&Fischer Verlag; 2014.
98. Falk T, Jönsson L, Pedersen H. Intramyocardial arterial narrowing in dogs with subaortic stenosis. *Journal of small animal practice*. 2004;45(9):448-53.
99. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1995;269(6):H2147-H54.
100. Erhardt W, Kölle P, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S. *Anästhesie und Analgesie beim Klein-und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*: Schattauer Verlag; 2012.

101. Brown RH, Walters DM, Greenberg RS, Mitzner W. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *Journal of Applied Physiology*. 1999;87(6):2362-5.
102. Xu Z, Alloush J, Beck E, Weisleder N. A Murine Model of Myocardial Ischemia-reperfusion Injury through Ligation of the Left Anterior Descending Artery. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2014(86).
103. Kadirvel M, Fairclough M, Cawthorne C, Rowling EJ, Babur M, McMahon A, et al. Detection of apoptosis by PET/CT with the diethyl ester of [18 F] ML-10 and fluorescence imaging with a dansyl analogue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014;22(1):341-9.
104. Sobrio F, Médoc M, Martial L, Delamare J, Barré L. Automated Radiosynthesis of [18F] ML-10, a PET Radiotracer Dedicated to Apoptosis Imaging, on a TRACERLab FX-FN Module. *Molecular Imaging and Biology*. 2013;15(1):12-8.
105. Schwarz A, Mosing M. Flüssigkeitstherapie beim Kleintier–eine Übersicht. *kleintier konkret*. 2014;17(06):20-9.
106. Popper BA. Impact of the genetic background on the development of diabetes-associated renal lesions in GIPRdn transgenic diabetic mice: Verlag Dr. Hut; 2013.
107. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008;44(3):250-4.
108. Ma H. PET imaging of cardiomyocyte apoptosis in a rat myocardial infarction model. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018;59(supplement 1):1530-.
109. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial

infarcts. Human pathology. 1997;28(4):485-92.

110. Wang X, Guo Z, Ding Z, Mehta JL. Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction. Journal of the American Heart Association. 2018;7(9):e008024.

111. Oskarsson HJ, Coppey L, Weiss RM, Li W-G. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis in the remote non-infarcted myocardium following large myocardial infarction. Cardiovascular Research. 2000;45(3):679-87.

112. Ibrahim T, Hackl T, Nekolla SG, Breuer M, Feldmair M, Schömig A, et al. Acute Myocardial Infarction: Serial Cardiac MR Imaging Shows a Decrease in Delayed Enhancement of the Myocardium during the 1st Week after Reperfusion. Radiology. 2009;254(1):88-97.

113. Happe SE. 3D-Infarktgrößenbestimmung im Kryoinfarktmodell der Maus. 2007.

114. Nossuli T, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet G, Ballantyne C, Michael L, et al. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2000;278(4):H1049-H55.

115. Jobmann M. Apoptose bei strukturellen Herzmuskelerkrankungen. 2002.

116. Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. Cardiovascular Research. 2004;61(3):414-26.

117. Weil BR, Young RF, Shen X, Suzuki G, Qu J, Malhotra S, et al. Brief Myocardial Ischemia Produces Cardiac Troponin I Release and Focal Myocyte Apoptosis in the Absence of Pathological Infarction in Swine. JACC: Basic to Translational Science. 2017:99.

118. Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 1998;93(3):s008-s12.
119. Krijnen P, Nijmeijer R, Meijer C, Visser C, Hack C, Niessen H. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(11):801-11.
120. Conci E, Pachinger O, Metzler B. Mouse Models for Myocardial Ischaemia/Reperfusion. *Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology*. 2006;13(7):239-44.
121. Römer D. Untersuchungen zur künstlichen Beatmung bei der Maus (*Mus musculus*) mit dem UNO Micro-Ventilator®: lmu; 2003.
122. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *The Journal of pathology*. 2003;199(2):221-8.
123. Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, et al. " Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation*. 1998;98(14):1422-30.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Herzens (Skizze Jessica Olivier). ...</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2: Übersicht einer Maus in der μPET-Bildgebung mittels [^{18}F]-FDG in verschiedenen Schnittebenen: Darstellung mit Fadenkreuz (Farbskala Volcano; Beispiel aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Großhadern).</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 3: Messung eines gesamten Tieres (Maus) in verschiedenen Schnittebenen mittels [^{18}F]-FDG im Modell der permanenten, ischämischen Kardiomyopathie: Weißer Pfeil deutet auf das Infarktareal hin (Farbskala: Volcano; Beispiel aus dieser Studie).....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 4: Chemische Strukturformel ML10.....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 5: Beispielhaftes Infarktgebiet des Ramus interventricularis anterior (Skizze Jessica Olivier).</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 6: Maus nach erfolgreicher Intubation (Beispiel aus dieser Studie). .</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 7: Maus in der Narkosesituation mit eröffneter Brustmuskulatur oberhalb des zweiten Interkostalraumes (ICR).....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 8: Herz mit gesetzter permanenter Ligatur des Ramus interventricularis anterior.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 9: Herz mit gesetzter transientser Ligatur des Ramus interventricularis anterior und gelockerten Fadenzügeln.</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 10: Darstellung der Zeitpunkte der Injektion von [^{18}F]-ML10 nach Infarktinduktion.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 11: Darstellung der Untersuchungen zu den fünf Zeitpunkten (ZP I – V) nach Infarkt.</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 12: Darstellung des Ablaufs der μPET-Messung.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 13: Darstellung des Ablaufs der Autoradiographie.</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 14: Herstellung [^{18}F]-ML10: 1. Ersatz des Tosylat durch [^{18}F]-Fluorid; 2. Abspaltung der Tertbutylgruppen. (Eigene Darstellung).....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 15: Beispiel eines μPET – das in dieser Studie verwendete Inveon Small Animal PET P120 von Siemens.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 16: Infarktdarstellung in der μPET Bildgebung, in verschiedenen Achsen mittels [^{18}F]-FDG (Farbskala: Volcano), [^{18}F]-ML10 (Farbskala: Ocean) sowie im Fusionsbild; Weißer Pfeil deutet auf das Infarktareal hin (Beispiel aus dieser Studie).....</i>	<i>47</i>

<i>Abbildung 17: Beispielhafte [^{18}F]-ML10 (Farbscala: Ocean) und [^{18}F]-FDG Anreicherung; Darstellung im Fusionsbild Axialansicht (Beispiel aus dieser Studie).</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 18: Beispielhafte [^{18}F]-ML10 (Farbscala: Ocean) und [^{18}F]-FDG Anreicherung; Darstellung im Fusionsbild Coronaransicht (Beispiel aus dieser Studie).</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 19: Beispielhafte [^{18}F]-ML10 (Farbscala: Ocean) und [^{18}F]-FDG Anreicherung; Darstellung im Fusionsbild Sagittalansicht (Beispiel aus dieser Studie).</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 20: Entnommene Organe des Brustkorbs einer Maus (10 Wochen alt) ohne Infarkt (Bild: Jessica Olivier).</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 21: Imaging Platte und Imaging Kassette (in dieser Studie verwendete Materialien).....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 22: HD-CR 35 NDT Folienscanner zum Auslesen der belichteten Imaging Platten (in dieser Studie verwendetes Gerät).</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 23: Beispielhafte [^{18}F]-ML10 Anreicherung in der Autoradiographie, Grauwerte in jedem Schnitt entsprechend Null bis Maximum (105); Verlauf: Herzbasis- Herzmitte -Herzspitze.</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im Modell der permanenten Ischämie in der Autoradiographie. Schwärzung ist proportional zu der Anreicherung der Radioaktivität.</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 25: Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im Target-to-Background Verhältnis; Vergleich des Target-to-Background - Verhältnisses zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der permanenten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im Modell der transienten Ischämie in der Autoradiographie. Schwärzung ist proportional zur der Anreicherung der Radioaktivität.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 27: Anreicherung von [^{18}F]-ML10 im Target-to-Background-Verhältnis; Vergleich des Target-to-Background – Verhältnisses zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der transienten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 28: Anreicherung in der Autoradiographie von [^{18}F]-ML10 im Target-to-Background Verhältnis; Vergleich des Target-to-Background - Verhältnisses zu den Zeitpunkten zwischen dem Modell der transienten (TI) und permanenten</i>	

<i>Ischämie (PI); Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 29: Infarktdarstellung in der μPET-Bildgebung mittels [^{18}F]-FDG (Farbskala: Volcano) in coronarer Ansicht. Weißer Pfeil deutet auf das Infarktareal hin (Beispiel aus dieser Studie).</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 30: Anreicherung in der μPET-Methode von [^{18}F]-ML10 in $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$; Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der permanenten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 31: Anreicherung in der μPET Methode von [^{18}F]-ML10 in $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$; Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der transiente Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 32: Anreicherung in der μPET Methode von [^{18}F]-ML10 in $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$; Vergleich der $(\% \text{ ID/g})_{\text{max}}$ zu den Zeitpunkten zwischen dem Modell der transienten (TI) und permanenten Ischämie (PI); Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 33: Darstellung von in Apoptose befindlicher (TUNEL-positiver) Kardiomyozyten im Ventrikelmyokard einer Maus im Modell der permanenten Ischämie.</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 34: Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard; Vergleich des prozentualen Anteils TUNEL-positiver Zellkernanschnitte zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der permanenten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 35: Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellkernanschnitte im Remotemyokard; Vergleich des prozentualen Anteils TUNEL-positiver Zellkernanschnitte zwischen den Zeitpunkten in dem Modell der transienten Ischämie; Fehlerindikator: standard error mean.</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 36: Vergleich des prozentualen Anteils der TUNEL-positiven Zellkernanschnitte im Remotemyokard zu den Zeitpunkten zwischen dem Modell der transienten (TI) und permanenten Ischämie (PI); Fehlerindikator: standard error mean.....</i>	<i>79</i>

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf möchte ich mich für die Übernahme der vorliegenden Dissertation an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München herzlich bedanken. Ich habe Ihre freundliche und positiv, anspruchsvolle Art in der Betreuung immer sehr geschätzt.

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Mentor und Wegweiser PD. Dr. med. Andrei Todica. Deine Unterstützung und das Vertrauen zur Durchführung dieser vielseitigen Forschungsarbeit haben mir stets den Rücken gestärkt.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Sibylle Ziegler. Ihre konstruktive Kritik und positive Unterstützung in jeder Situation waren für mich herausragend.

Ebenfalls möchte ich mich sehr herzlich bei PD. Dr. med. vet. Andreas Parzefall für den begleitenden Rat und die Unterstützung bedanken.

Bei Mathias Zacherl möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Dein immer offenes Ohr, deine chirurgischen Fähigkeiten und deine stets unbeschwerte Art haben nicht zuletzt meine Arbeit in der Abteilung zu etwas Besonderem gemacht.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bartenstein bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in der Abteilung für Nuklearmedizin in München, Großhadern anzufertigen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Partner Dominik Roithmeier, der für mich alles in Relation setzt. Meinem Bruder Roman und meiner Schwester Vivienne für die Motivation und den Ehrgeiz, dem einen nur jüngere Geschwister geben können. Meiner Mutter Kirsten für das stete Vertrauen in die „Große“. Und ganz besonders meinem Vater Michael der mit Herz und Verstand jeden meiner Schritte begleitet.